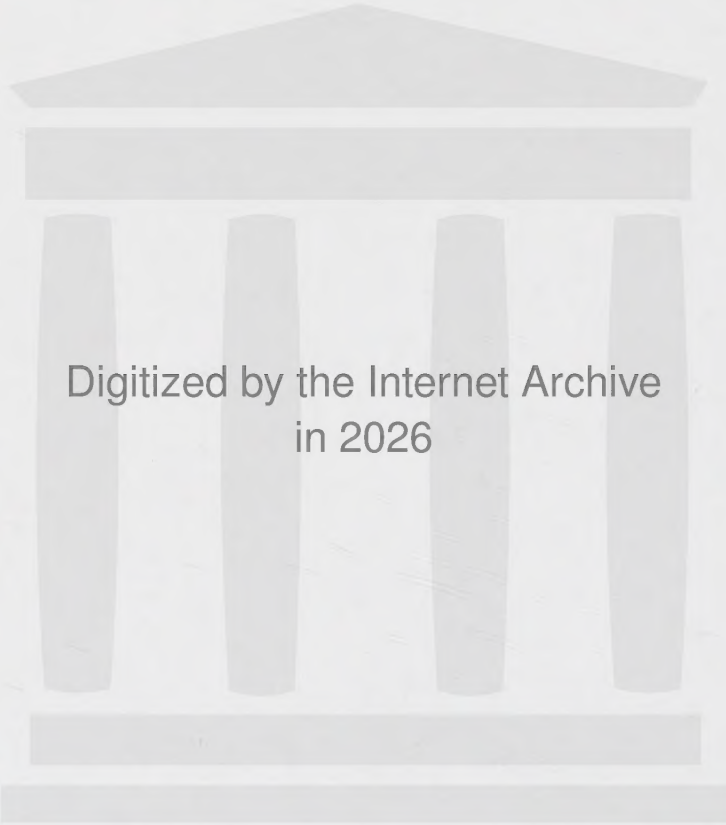


Beltinger, Annamaria

Disbui. München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555224_0006

Aus der medizinischen Poliklinik der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. N. Zöllner

Untersuchungen über Mechanismen des Einflusses von
Nahrungspurinen auf die Allopurinol-induzierte
Orotacidurie und Orotidinurie

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

ANNAMARIA BELTINGER

aus

GÜNZBURG/DONAU

Jahr

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. W. Gröbner

Mitberichterstatter: Professor Dr. N. Zöllner

Professor Dr. V. Herzog

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Sebastian Reiter

Dekan: Professor Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. März 1988

I. EINFÜHRUNG

Die hereditäre Orotazidurie ist eine sehr seltene angeborene Störung des Pyrimidinstoffwechsels, die mit verzögerter geistiger und körperlicher Entwicklung, hypochromer Anämie bei megaloblastärem Knochenmark und einer excessiv gesteigerten Orotsäureausscheidung im Urin einhergeht (Huguley et al., 1959).

Ursache dieser Krankheit ist ein doppelter Enzymdefekt der Pyrimidinsynthese de-novo (Smith et al., 1961): das Synthesewischenprodukt Orotsäure kann aufgrund des Fehlens der Orotsäure-Phosphoribosyltransferase (OPRT) nicht in Orotidinmonophosphat (OMP) und letzteres aufgrund des Fehlens der OMP-Decarboxylase (ODC) nicht in Uridinmonophosphat (UMP) umgewandelt werden (Schritt 5 und 6 der Pyrimidinbiosynthese, s. Abb. 1). Es resultiert ein Mangel an Pyrimidinnucleotiden. Da die Pyrimidinnucleotide ihre de-novo-Synthese über eine feedback-Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase (Schritt 1 der Pyrimidinbiosynthese, s. Abb. 1) regulieren (Tatibana und Shigesada, 1972; Pausch et al., 1975), führt ihr Mangel zu einer Aktivitätssteigerung dieses Enzyms und damit zu einer deutlich erhöhten Syntheserate im ersten Abschnitt der Pyrimidinbiosynthese bis zur Orotsäure. Da das Fehlen der OPRT durch die vermehrte Bildung ihres Substrats Orotsäure nicht kompensiert werden kann, bewirkt dieser endogene Regulationsmechanismus keine Normalisierung der Pyrimidinnucleotid-Spiegel sondern lediglich eine bis aufs Tausendfache der Norm gesteigerte Orotazidurie (bis 1 g/die) mit Kristallurie. Die hereditäre Orotazidurie kann jedoch erfolgreich durch exogene, orale Uridin-Dauer-Substitution behandelt werden (Becroft und Phillips, 1965): dieses Pyrimidin-Nucleosid wird durch die Uridin-Kinase, über den sog. "salvage pathway" (Reaktion 10, Abb. 1), zu Uridinmonophosphat (UMP) phosphoryliert. Hierdurch kann der angeborene Enzymdefekt der OPRT und ODC umgangen und eine Normalisierung der Pyrimidinnucleotidspiegel erreicht werden. Diese bewirkt einerseits eine Besserung der klinischen Symptome, andererseits über die o.g. feedback-Hemmung der Carbamylphosphat-

synthetase einen Rückgang der Orotazidurie.

Neben der hereditären Orotacidurie gibt es weitere Ursachen einer vermehrten Orotsäureausscheidung im Urin, die nicht auf einem Enzymdefekt in der Pyrimidinbiosynthese beruhen:

- Bei angeborenen Enzymdefekten des Harnstoffzyklus

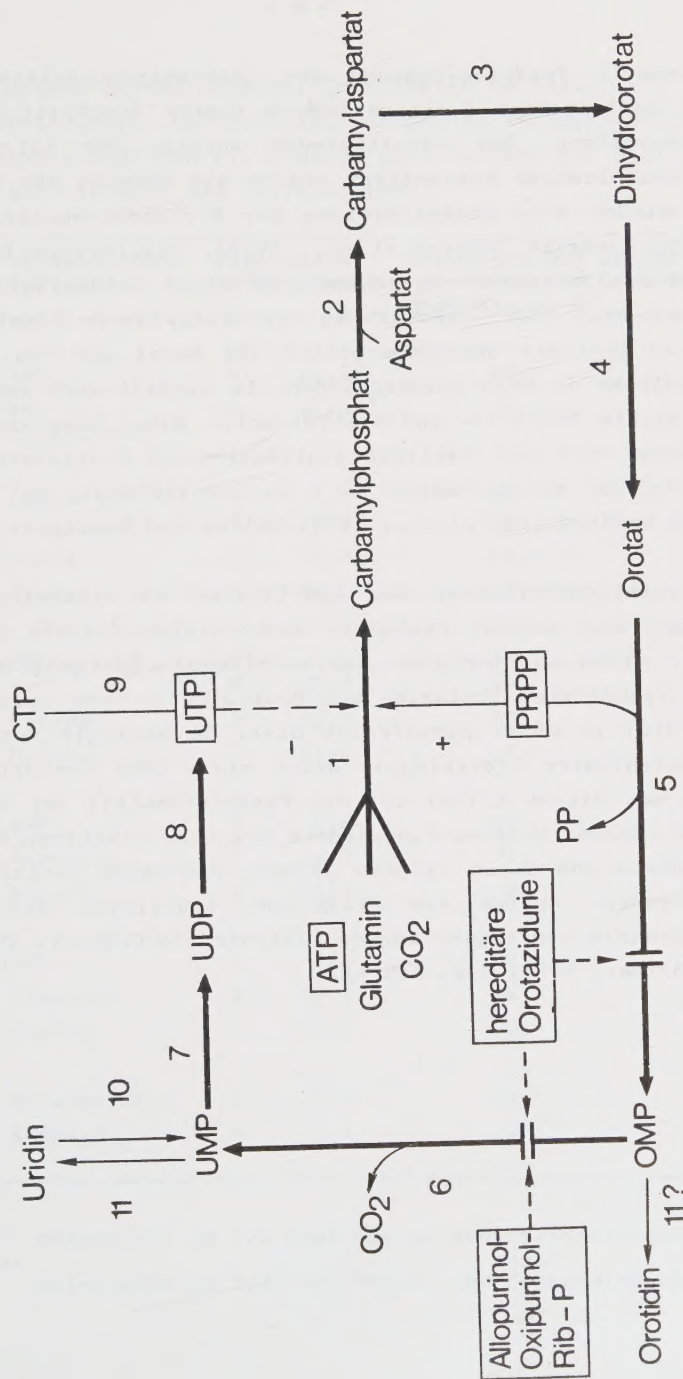
i.E. Mangel an Ornithintranscarbamylase, Argininosuccinatsynthetase oder Arginase (Levin et al., 1969; Lis et al., 1970; Snyderman et al., 1977; Walser, 1983) wird in den Mitochondrien für den Harnstoffzyklus synthetisiertes Carbamylphosphat nicht verbraucht; es gelangt daher ins Zytoplasma, wo es in die Pyrimidinsynthese de-novo eingeschleust wird. Da die OPRT-Aktivität nicht ausreicht, die vermehrt gebildete Orotsäure vollständig in OMP umzuwandeln, kann es zu einer bis aufs Tausendfache erhöhten Orotsäureausscheidung im Urin kommen (Bachmann und Colombo, 1980).

- Eine exogene Orotazidurie

tritt unter Therapie mit dem Uricostatikum Allopurinol auf (Fox et al., 1970; Kelley und Beardmore, 1970). Sie beruht auf einer Hemmung der ODC (s. o. u. Abb. 1) durch Mononucleotid-analoge Metaboliten dieses Medikaments, die in vivo gebildet werden: In der Rattenleber wurden drei Nucleotide von Allopurinol und seinem Hauptmetaboliten Oxipurinol in Konzentrationen nachgewiesen, die z.T. deutlich über den jeweiligen Hemmkonstanten für die ODC lagen (Nelson et al., 1973, Fyfe et al., 1973): 1-N-Ribosyl-Oxipurinol-5'-Phosphat ($K_i = 0,5 \times 10^{-9} \text{M}$) und 1-N-Ribosyl-Allopurinol-5'-Phosphat ($K_i = 1 \times 10^{-6} \text{M}$), synthetisiert durch die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (Way und Parks, 1958; McColister et al., 1964; Krenitsky et al., 1969), sowie 7-N-Ribosyl-Oxipurinol-5'-Phosphat ($K_i = 4 \times 10^{-8} \text{M}$), das von der OPRT synthetisiert wird (Fyfe et al., 1973). Die Bildung dieser Inhibitoren bewirkt nach einmaliger Allopurinol-Gabe einen vorübergehenden Abfall der Pyrimidin-Nukleotid-Konzentrationen in der Leber. Wie bei der hereditären Orotacidurie (s.o.) führt dieser über eine

Abb. 1:

Pyrimidinsynthese-de-novo. Beteiligte Enzyme: 1. Carbamylphosphatsynthetase II. 2. Aspartattranscarbamylase. 3. Dihydroorotase. 4. Dihydroorotatdehydrogenase. 5. Orotsäure-Phosphoribosyltransferase (OPRT). 6. Orotidinmonophosphat (OMP)-Decarboxylase (ODC). 10. Uridinkinase.



verminderte feedback-Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase zu einer gesteigerten Syntheserate im ersten Abschnitt der Pyrimidinbiosynthese. Der resultierende Anstieg der intrazellulären OMP-Konzentration kompensiert jedoch die Hemmung der ODC, so daß bald wieder eine Normalisierung der Pyrimidin-Nukleotid-Konzentration eintritt (Nelson et al., 1973). Das intrazellulär in erhöhter Konzentration vorliegende OMP hemmt seinerseits die OPRT (Tax et al., 1976), weshalb es zur Orotazidurie kommt, und wird z.T. zu Orotidin dephosphoryliert (El Kouni und Cha, 1982) und als solches im Urin ausgeschieden. Es handelt sich somit um eine kombinierte Orotazid- und Orotidinurie. Unter Gabe von Allopurinol kann sich die tägliche Orotsäure- und Orotidinausscheidung im Urin von normalerweise je 1 mg dosisabhängig auf bis zu je 300 mg erhöhen (Fox et al., 1970; Kelley und Beardmore 1970).

Bei Ernährungsversuchen über den Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote beobachteten Zöllner und Gröbner (1971) einen ausgeprägten und anhaltenden Rückgang der Allopurinol-induzierten Orotazid- und Orotidinurie nach Zulage von RNS (4 g/die) zu einer purinfreien Diät. In Analogie zur Reduktion der hereditären Orotazidurie durch orale Gabe von Uridin (s.o.) hätte man diesen Effekt auf den Pyrimidinanteil der RNS zurückführen können. Weitere Experimente mit Gabe einzelner Nukleotide, Nukleoside und Basen zeigten jedoch, daß neben Pyrimidinen auch verschiedene Purine die Allopurinol-induzierte Orotazid- und Orotidinurie verringern können (Zöllner und Gröbner, 1977; Gröbner und Zöllner, 1983; vgl. Tab. 1).

Tab. 1: Abnahme der Allopurinol-induzierten Orotazid- und Orotidinurie bei purinfrei ernährten Versuchspersonen nach Zulage von Pyrimidinen oder Purinen zur Diät. (Nach Gröbner und Zöllner, 1983).

verabreichte Substanz	Tagesdosis in g in mmol		Reduktion der Gesamtausscheidung von Orotsäure und Orotidin in %
RNS	4	12,4 ^x	68
RNS Hydrolysat	4	11,8 ^{xx}	71
UMP	1	3,1	29
	3	9,3	65
Uridin	3	12,3	66,5
Uracil	3	26,8	0
CMP	1	3,1	35
	3	9,3	45
Cytidin	3	12,3	54
Cytosin	3	27,0	0
AMP	3	8,6	48
Adenosin	3	11,2	33
Adenin	3	22,2	9
GMP	1	2,8	50
Guanosin	3	10,6	36
Guanin	3	22,2	0
Hypoxanthin	3	22,0	60
Xanthin	3	19,7	0

^x entspricht je 6,2 mmol Purin- und Pyrimidinbasen

^{xx} entspricht je 5,9 mmol Purin- und Pyrimidinbasen

Die genannten Autoren diskutierten folgende Mechanismen, durch die der Einfluß oral verabreichter Purine auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidininurie zustande kommen könnte:

1. Die verabreichten Purine könnten die Bildung der Allopurinol-Metaboliten verhindern, die die Hemmung der ODC bewirken, z.B. durch Verbrauch von PRPP (Zöllner und Gröbner, 1971; Zöllner und Gröbner, 1977). Gegen diesen Mechanismus wendeten Zöllner und Gröbner (1977) ihre Beobachtung ein, daß der unter alleiniger Allopurinol-Gabe auftretende Anstieg der ODC-Aktivität im Erythrocyten-Lysat (vgl. Gröbner und Kelley, 1975) unter gleichzeitiger Verabreichung von Allopurinol und Purinen unverändert blieb bzw. sich weiter fortsetzte (vgl. Gröbner und Zöllner, 1983). Allerdings nahm die ODC-Aktivität auch in der letzten Versuchsperiode nach Absetzen von Allopurinol noch weiter zu (Gröbner und Zöllner, 1983), während die Orotsäureausscheidung bereits wieder in den Normbereich zurückgekehrt war. Man kann daher offensichtlich aus der Aktivität der ODC im Erythrocyten-Lysat nicht auf die Aktivität der ODC in vivo schließen (vgl. Kelley, Diskussionsbemerkung zu Zöllner und Gröbner, 1977, S. 176).
2. Die renale Ausscheidung von Orotsäure könnte gehemmt werden. Hiergegen wurde angeführt, daß es beim Übergang von Normalkost mit üblichem Puringehalt auf purinfreie Formeldiät nicht zu einem Anstieg der Orotsäureausscheidung kommt (Zöllner und Gröbner, 1977; Gröbner und Zöllner, 1983). Dieses Argument gilt jedoch nur für Harnsäure, da Nahrungspurine in Abwesenheit von Allopurinol vollständig in Harnsäure umgewandelt werden; eine Beeinflussung der Orotsäureausscheidung durch die Harnsäurevorstufen Hypoxanthin und Xanthin, die bei gleichzeitiger Verabreichung von Purinen und Allopurinol in großer Menge ausgeschieden werden, läßt sich hiermit jedoch keinesfalls ausschließen.

3. Eine Hemmung der Dihydroorotase (Zöllner und Gröbner, 1977) wurde von Bresnick und Blatchford (1964) nachgewiesen: das im 100000 xg-Überstand von Novikoff-Aszites-Hepatom-Zellen erhaltene Enzym wurde von zahlreichen Purin- und Pyrimidin-Nucleosiden und -Nucleotiden mit K_i -Werten zwischen 50 und 400 μM gehemmt. Kennedy (1974) konnte diese Befunde nicht reproduzieren, er vermutete das Vorliegen eines Artefakts.
4. Eine direkte Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase durch Purine (Zöllner und Gröbner, 1977 und 1983) wurde von Tatibana und Shigesada (1972) an einem teilweise gereinigten Enzympräparat aus Mäusemilz untersucht: in der sehr hohen Konzentration von 2mM bewirkten Adenosin, Inosin und Guanosin eine Hemmung von 5 - 7 %, AMP 8 %, IMP 16 %, GMP 17 %, ADP 48 %, GDP 26 % und GTP 56 %; von diesen Purinen erreichen unter Normalbedingungen nur ADP mit 0,3 mM und GTP mit 0,56 mM (nach Jones, 1980) intrazelluläre Konzentrationen, die eine hemmende Wirkung auf die Carbamylphosphatsynthetase möglich erscheinen lassen, falls es bei der Zulage von Purinen zur Diät zu einem Konzentrationsanstieg dieser Nucleotide kommen sollte. Dies ist jedoch höchstwahrscheinlich nicht der Fall: Wie an Zellkulturen in vitro nachgewiesen wurde, führt der Zusatz von Adenin, Adenosin oder Inosin zum Medium hauptsächlich zu einem Anstieg der ATP-Konzentration, während sich die AMP- und ADP-Konzentration nur geringfügig ändert (Yushok, 1971; Snyder und Henderson, 1973; Snyder und Seegmiller, 1976); da ATP ein Substrat der Carbamylphosphatsynthetase ist, kann ein Anstieg seiner Konzentration nur eine Aktivierung dieses Enzyms bewirken (vgl. Tatibana und Shigesada, 1972). Die intrazelluläre Konzentration der Guanin-Nucleotide kann in vitro durch Zusatz von Guanin oder Guanosin zum Zellkulturmedium auf das 4- bis 5-fache angehoben werden (Snyder und Henderson, 1973; Brenton et al., 1977).



Oral verabreichte Guanin-Verbindungen werden jedoch nach Absorption und Abbau zu Guanin durch die hochaktive Guanase von Dünndarm und Leber (Engelman et al., 1964; Rosenbloom et al., 1967; Galanti et al., 1975) rasch zu Xanthin deaminiert und können daher nur zu einem kleinen Teil von der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) zu GMP aufgebaut und damit dem Guanin-Nucleotid-Pool zugeführt werden (vgl. Plentl und Schönheimer, 1944; Brown et al., 1948; Simmonds et. al, 1973b; Burr ridge et al., 1976; Ho et al., 1979). Auch bei Hemmung der Xanthinoxidase durch Allopurinol resultiert kein vermehrter Aufbau von oral verabreichtem Guanin zu intrazellulären Guanin-Nucleotiden (Simmonds et al., 1973b), da die Guanase durch das nur wenig akkumulierende Xanthin offensichtlich nicht gehemmt wird: Sogar bei Patienten mit vollständigem Fehlen der Xanthinoxidase (Xanthinurie) wird verabreichtes Guanin wesentlich weniger in Nucleotide eingebaut als Hypoxanthin oder Adenin (Ayvazian und Skupp, 1965). Xanthin wird im Gegensatz zu Hypoxanthin und Guanin nur in minimalem Umfang phosphoribosyliert (Henderson und Khoo, 1965; Kelley et al., 1967; Krenitsky et al., 1969) und ist daher ebenso wie Harnsäure als Endprodukt des Purinstoffwechsels anzusehen.

5. Die Beeinflussung der Pyrimidinsynthese durch Purine könnte auch auf einem vermehrten Verbrauch von PRPP beruhen (Gröbner und Zöllner, 1983). Zahlreiche Autoren haben eine Abnahme der intrazellulären PRPP-Konzentration nach Zusatz von Purinen zu Zellen in vitro beschrieben: Bagnara et al. (1974) führten die PRPP-Abnahme in der ersten Phase einer Inkubation von Ehrlich-Aszites-Tumor-Zellen mit Adenin oder Guanin (0-100µM) auf einen gesteigerten PRPP-Verbrauch durch die Phosphoribosylierung der Purinbasen zu den Nucleotiden AMP und GMP zurück; im weiteren Verlauf der Inkubation blieb der intrazelluläre PRPP-Spiegel auch nach Entfernung von Adenin oder Guanin aus dem Medium erniedrigt, was mit einer Hemmung der PRPP-Synthetase durch eine langfristige Erhöhung des Adenin- oder Guanin-Nucleotid-Pools erklärt wurde (vgl. Fox u. Kelley, 1972).

Planet und Fox (1976) beobachteten demgegenüber nach Inkubation von Erythrocyten mit den Purin-Nucleosiden Adenosin, Inosin oder Guanosin in der sehr hohen Konzentration von 1,25mM trotz unveränderter Nucleotidspiegel eine Abnahme von PRPP-Synthese, die sie auf eine Verminderung der intrazellulären Phosphatkonzentration infolge phosphorolytischer Spaltung der Nucleoside zurückführten.

PRPP ist zwar ein Aktivator der Carbamylphosphatsynthetase (Tatibana und Shigesada, 1972), eine Abnahme seiner Konzentration nach Zusatz von Purinen zum Medium muß jedoch nicht zu einer verminderten Aktivität dieses Enzyms und damit zu einer verminderten Orotsäurebildung führen: Die durchschnittliche intrazelluläre PRPP-Konzentration liegt bei 100 μ M; die zur halbmaximalen Aktivierung der Carbamylphosphatsynthetase erforderliche PRPP-Konzentration beträgt weniger als 15 μ M und liegt damit unter dem K_m -Wert der OPRT für PRPP (Jones, 1980). Es kommt daher erst bei einem ausgeprägten Rückgang der intrazellulären PRPP-Konzentration zu einem Aktivitätsverlust der Carbamylphosphatsynthetase, der jedoch stets mit einer gleichzeitigen Aktivitätsabnahme der OPRT verknüpft ist. Der resultierende Abfall der UTP-Konzentration bewirkt nun aber eine verminderte Rückkopplungshemmung der Carbamylphosphatsynthetase. Führen die zugesetzten Purine nun noch zu einer erhöhten intrazellulären ATP-Konzentration (s.o.), kann im Endeffekt sogar eine gesteigerte Aktivität der Carbamylphosphatsynthetase mit vermehrter Anhäufung von Orotsäure resultieren: Nach Inkubation von Mäuse-Fibroblasten mit 0,1mM Adenosin und ^{14}C -Aspartat beobachteten Ishii und Green (1973) eine Abnahme der Uridin-Nucleotid-Synthese um 49 %; gleichzeitig kam es jedoch zu einer Akkumulierung von Orotsäure in Zellen und Medium (+477 %). Insgesamt ergab sich hieraus ein Anstieg der Pyrimidin- bzw. Carbamylphosphatsynthese um 45 %. Die als Ursache der Orotsäureakkumulierung vermutete Abnahme der PRPP-Konzentration wurde von Snyder und Seegmiller (1976) an menschlichen Lymphoblasten nach Inkubation mit 50 μ M Adenosin, AMP oder cAMP nachgewiesen. Der in vitro zu beobachtende Einfluß von

Purinen auf die Pyrimidin- bzw. Drotsäuresynthese hängt sehr stark von der Art der verwendeten Zellen und der Zusammensetzung des Mediums ab, wobei insbesondere der Konzentration des anorganischen Phosphats, eines Aktivators der PRPP-Synthetase, große Bedeutung zukommt. Die Übertragung dieser Ergebnisse auf die Situation in vivo ist daher nur mit großen Einschränkungen möglich, insbesondere auch im Hinblick darauf, daß das am meisten untersuchte und in vitro besonders wirkungsvolle Adenosin (Ishii u. Green, 1973; Snyder und Seegmiller, 1976; Snyder et al., 1978; Gudas et al., 1978) nach oraler Gabe noch im Darmlumen deaminiert und als Inosin absorbiert wird (Levene und London, 1929; Sonoda und Tatibana, 1978). Inosin wird in den Mukosazellen phosphorolytisch zu Hypoxanthin gespalten, das durch die in Dünndarmmucosa und Leber sehr aktive Xanthinoxidase (Engelman et al., 1964; Della Corte et al., 1969; Mousson et al., 1983) zu Xanthin und dann zu Harnsäure oxidiert wird. Normalerweise kann daher nur ein kleiner Teil des aus Nahrungspurinen (Adenosin, Inosin, AMP, IMP) freigesetzten Hypoxanthins durch die HGPRT (vgl. Rosenbloom et al., 1967) unter PRPP-Verbrauch zu IMP aufgebaut und in den Adenin- und Guanin-Nucleotid-Pool eingeschleust werden (Getler et al., 1949; Burrdige et al., 1976; Sonoda und Tatibana, 1978; Ho et al., 1979). Oral verabreichtes Adenosin, Inosin, AMP, IMP oder Hypoxanthin dürfte daher ebenso wie Guanin und seine Verbindungen (s.o.) normalerweise keinen Einfluß auf den Pyrimidinstoffwechsel in vivo ausüben. Bei gleichzeitiger Gabe von Allopurinol liegt jedoch eine andere Situation vor: im Gegensatz zum Guanin-Abbau wird der Hypoxanthin-Abbau durch Allopurinol gehemmt, wodurch die Reutilisierung von Hypoxanthin erhöht wird (Pomales et al., 1963; Edwards et al., 1981).

Bei gleichzeitiger Gabe von Allopurinol könnte daher die orale Verabreichung von Adenosin, Inosin, AMP, IMP oder Hypoxanthin eine ähnliche Wirkung auf den Pyrimidinstoffwechsel ausüben wie der Zusatz von Hypoxanthin zu Zellen *in vitro*: Snyder et al. (1978) beobachteten bei Inkubation menschlicher Lymphoblasten mit 0,5 mM Hypoxanthin eine Abnahme der PRPP-Konzentration um 97 % und der Uridin-Nucleotidkonzentration um 52 %, jedoch keine Akkumulierung von Orotsäure. Dieses Phänomen wurde auf den nur minimalen Anstieg (+ 2 %) der Adenin-Nucleotid-Konzentration zurückgeführt; offensichtlich wird die OPRT bei PRPP-Mangel nur dann zum geschwindigkeitsbestimmenden Enzym der Pyrimidinsynthese *de-novo*, wenn die Carbamylphosphatsynthetase nicht nur durch eine verminderte UTP-Hemmung, sondern auch durch eine erhöhte ATP-Konzentration aktiviert wird (vgl. Chen und Jones, 1979; Jones, 1980).

Im Gegensatz zu den genannten Purinmononucleotiden, -nucleosiden und -basen wird oral verabreichtes freies Adenin nach seiner Absorption nur sehr langsam in Dünndarmmucosa und Leber abgebaut: die hier lokalisierte Xanthinoxidase (s.o.) oxidiert Adenin mit geringer Aktivität (Krenitsky et al., 1972) zu den sehr wenig löslichen Stoffwechselendprodukten 8-Hydroxy- und 2,8-Dihydroxy-Adenin; eine Adenin-Deaminase existiert im Säugetier-Organismus nicht (Bendich et al., 1950). Der Hauptanteil des absorbierten Adenins kann daher von der insbesondere in der Leber sehr aktiven Adeninphosphoribosyltransferase (APRT; Rosenbloom et al., 1967) unter PRPP-Verbrauch zu AMP aufgebaut werden. Exogenes freies Adenin wird daher wesentlich mehr als alle anderen Purine in die Nucleotid-Pools und Nucleinsäuren inkorporiert (Brown et al., 1948; Wyngaarden et al., 1959; Ayvazian und Skupp, 1965; Seegmiller et al., 1968; Bartlett, 1977; Ho et al., 1979). In Gegenwart von Allopurinol wird die Oxidation von Adenin weiter reduziert (Schulman et al., 1971; Van Acker et al., 1977) und das aus dem AMP-Abbau entstehende Hypoxanthin vermehrt reutilisiert (Edwards et al., 1981), wobei noch vorhandenes freies Adenin gegenüber gebildetem Hypoxanthin bevorzugt phosphoribosyliert wird (Henderson und Khoo, 1965).

Obwohl keine Literatur-Angaben über die maximale Absorptions- und Metabolisierungsrate von oral verabreichtem Adenin beim Menschen vorliegen, muß man daher annehmen, daß gerade auch in Gegenwart von Allopurinol oral verabreichtes Adenin einen wesentlich größeren PRPP-Verbrauch als alle anderen Purine und insbesondere Guanin und seine Derivate bewirkt. Nachdem in den Versuchen von Gröbner und Zöllner (1983) eine kleine Dosis GMP (2,8 mmol/die) jedoch eine starke Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie um 50 % verursachte, während eine sehr hohe Dosis Adenin (22,2 mmol/die) die Orotacid- und Orotidinurie nur um 9 % reduzierte, erscheint ein Zusammenhang zwischen dem PRPP-Verbrauch und der Reduktion der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie durch Nahrungspurine fraglich.

II. ZIEL DER ARBEIT

Wie in der Einführung dargestellt, wurden von Zöllner und Gröbner in mehreren Arbeiten insgesamt 5 Mechanismen benannt, durch die oral verabreichte Purine die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie reduzieren könnten. Nachdem eindeutige Argumente weder für noch gegen einen dieser Mechanismen angeführt werden können, sollten in der vorliegenden Arbeit mittels eines erneuten Ernährungsversuchs weitere Anhaltspunkte für derartige Mechanismen gewonnen werden. Hierzu erhielten gesunde Versuchspersonen 3 Wochen lang eine purinfreie, synthetische "Formeldiät"; in der 2. und 3. Woche wurde täglich Allopurinol, in der 3. Woche zusätzlich eine Purinverbindung oral verabreicht. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Zöllner und Gröbner (vgl. Tab. 1) wurden die Purinverbindungen in isomolarer Dosis gegeben, um die Wirksamkeit der einzelnen Substanzen besser miteinander vergleichen zu können. Die Tagesdosis wurde auf $7,5 \text{ mmol/l}, 73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche festgesetzt, was einem Drittel der von Zöllner und Gröbner verabreichten Purinbasen-Dosis entspricht (vgl. Tab. 1). Purine und Allopurinol wurden entweder wie bei Zöllner und Gröbner über den Tag in 3 Teildosen aufgeteilt oder aber als Einzeldosis gegeben, um die Tages-Ausscheidungsprofile der Pyrimidin-, Purin- und Allopurinol-Metaboliten untersuchen und miteinander korrelieren zu können. Im einzelnen wurde die Ausscheidung folgender Metaboliten in den täglich gesammelten 24-Stunden-Urinen der Versuchspersonen bestimmt:

1. Orotsäure und Orotidin:

In den Untersuchungen von Zöllner und Gröbner wurden Orotsäure und Orotidin im Urin gemeinsam mittels des colorimetrischen Tests von Rogers und Porter (1968) gemessen. Von einer getrennten Bestimmung der Orosäure- und Orotidinausscheidung, die mit einer neu entwickelten HPLC-Methode durchgeführt wurde, waren Hinweise auf Mechanismen der Purinwirkung zu erwarten:

- bei einer Abnahme der ODC-Hemmung, sei es infolge einer verminderten Absorption von Allopurinol oder einer eingeschränkten Bildung seiner Nucleotid-Derivate (s. unten 3.), sollte die Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin etwa im gleichen Umfang zurückgehen.
- Paglia und Valentine (1975) wiesen eine Hemmung der Pyrimidin-5' Nucleotidase menschlicher Erythrocyten durch Adenosin ($K_i = \text{ca. } 0,3 \text{ mM}$), Inosin ($K_i = \text{ca. } 0,4 \text{ mM}$) und Adenin ($K_i = \text{ca. } 1,3 \text{ mM}$) nach; Hypoxanthin und Xanthin waren dagegen wirkungslos. Sollten auch die Pyrimidin-Nucleotidasen anderer Organe durch Nahrungspurine bzw. deren Metaboliten gehemmt werden, könnte der geringere Bedarf an neu-synthetisierten Pyrimidinen zu einem Rückgang sowohl der Orotsäure- als auch der Orotidinausscheidung führen; bei gleichzeitiger Hemmung der Orotidinbildung aus OMP würde dabei die Abnahme der Orotidinausscheidung überwiegen.
- Eine Hemmung der renalen Ausscheidung durch Purinmetaboliten könnte Orotsäure und Orotidin in unterschiedlichem Ausmaß betreffen: Da nur Orotsäure, nicht aber Orotidin, ein Zwischenprodukt der Pyrimidinsynthese de-novo darstellt (vgl. Abb. 1), kann es nur bei einer Hemmung der Orotsäureausscheidung zu einem Rückgang der Pyrimidinsyntheserate kommen. Als Hinweis auf Interaktionen zwischen Purin- und Pyrimidinausscheidung läßt sich die urikosurische Wirkung von Orotsäure anführen (Fallon et al., 1962).
- Ein größerer PRPP-Verbrauch bei der Reutilisation von Nahrungspurinen sollte in erster Linie eine Abnahme der Orotidinausscheidung bewirken, da Orotsäure bei reduzierter PRPP-Konzentration vermindert zu OMP umgesetzt werden kann.

2. Harnsäure, Xanthin und Hypoxanthin:

Als Ursache des fehlenden Einflusses von Guanin und Xanthin auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie wurde von Gröbner und Zöllner (1983) eine geringe intestinale Absorption dieser Substanzen vermutet. Simmonds et al. (1973 a) fanden jedoch bei Schweinen unter Allopurinoltherapie (2,2 mmol/kg/ 24 Std.) und hochdosierter Gabe von Guanin-HCl (1 mmol/kg/ 24 Std.) einen Anstieg der Gesamtpurinausscheidung auf das 2,2fache; dennoch kam es auch hier zu keiner Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie. Literaturangaben über die intestinalen Absorptionsquoten der einzelnen Purine beim Mensch in Gegenwart von Allopurinol existieren bisher nicht. Es ist infolgedessen auch unklar, ob die im Vergleich mit z.B. Hypoxanthin sehr geringe Wirkung hoher Adenindosen auf die Orotacid- und Orotidinurie (vgl. Tab. 1) auf unterschiedlichen intestinalen Absorptionsquoten beruht. In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Anstieg der Gesamtpurinausscheidung nach Zulage der einzelnen Purine zur purinfreien Formeldiät bestimmt: der Anstieg der Gesamtpurinausscheidung ist zwar nicht mit der intestinalen Absorptionsquote gleichzusetzen, da ein Teil der absorbierten Purine reutilisiert werden kann, wodurch es zu einer Abnahme der Purinsynthese de-novo kommt (Seegmiller et al., 1968); der Anstieg der Gesamtpurinausscheidung entspricht jedoch der Mindestmenge, die vom jeweils verabreichten Purin absorbiert wurde. In Gegenwart von Allopurinol erfolgt die Purinausscheidung im wesentlichen in Form von Harnsäure und den Harnsäurevorstufen Xanthin und Hypoxanthin. Die getrennte Messung dieser sog. Oxipurine mittels HPLC erlaubt weitere Schlüsse auf die Wirkungsmechanismen der verabreichten Purine:

- Der PRPP-Verbrauch nach oraler Puringabe hängt vom Abbauweg der verabreichten Substanz ab: Guanin und seine Verbindungen (Guanosin, GMP) werden ausschließlich zu Xanthin und Harnsäure abgebaut, die als Stoffwechselendprodukte nicht nennenswert phosphoribosyliert werden; dagegen fällt beim Abbau von Hypoxanthin- und Adenin-Derivaten in Gegenwart von Allopurinol eine größere Menge Hypoxanthin an, die unter entsprechendem PRPP-Verbrauch reutilisiert werden kann.
- Bei einer Hemmung der Pyrimidinsynthese in ihrem ersten Abschnitt (Schritt 1 - 4, vgl. Abb. 1) oder der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin müßten die Ausscheidungsprofile von Orotsäure und Orotidin mit denen von Hypoxanthin und Xanthin entsprechend korrelieren.

3. Allopurinol, Oxipurinol, Allopurinol-1-Ribosid:

Oral verabreichtes Allopurinol wird normalerweise zu ca. 80 % absorbiert und im Urin zu 60 - 70 % in Form des Hauptmetaboliten Oxipurinol, zu je 6 - 12 % als unverändertes Allopurinol und Allopurinol-1-Ribosid, sowie zu 1 - 3 % als Oxipurinol-7-Ribosid ausgeschieden (Elion, 1978). Durch Bestimmung der Ausscheidung von Allopurinol und seinen Metaboliten sollte festgestellt werden, ob oral verabreichte Purine die intestinale Absorption von Allopurinol hemmen; dies könnte insbesondere bei Gabe von Hypoxanthin der Fall sein, zu dem Allopurinol strukturanalog ist. Eine verminderte Allopurinol-Absorption würde zu einer geringeren Bildung der Allopurinol- und Oxipurinol-Nucleotide und damit zu einer schwächeren Hemmung der ODC führen. Der gleiche Effekt könnte bei unverminderter Allopurinol-Absorption durch eine Hemmung der Bildung von Allopurinol- und Oxipurinol-Nucleotiden zustandekommen. In der Tat wurde ein Einfluß exogener Purine auf den Allopurinol-Metabolismus bereits beschrieben:

Bei Schweinen konnte die Bildung von Allopurinol-Ribosid, das bei einer Allopurinol-Dosis von 50 mg/kg/ die 46,9 % der Metaboliten im Urin repräsentierte, durch die parenterale Gabe von 100 mg/kg (0,74 mmol/kg) Adenin vollständig unterdrückt werden (Cameron et al., 1977). Dieses Phänomen wurde auf eine kompetitive Hemmung der Purinnucleosidphosphorylase durch Hypoxanthin zurückgeführt (vgl. Elion, 1978). Nach Untersuchungen von Reiter et al. (1983, 1986 a) wird Allopurinol-Ribosid jedoch in vivo nicht direkt durch die Purinnucleosidphosphorylase, sondern indirekt über das Nucleotid Allopurinol-1-Ribotid durch die HGPRT gebildet. Eine Abnahme der Allopurinol-Ribosid-Ausscheidung entspricht daher einer verminderten Bildung des ODC-Hemmers Allopurinol-Ribotid. Aufgrund des relativ hohen K_i -Werts von Allopurinol-Ribotid ($1 \times 10^{-6}M$, s.o.) erscheint es jedoch fraglich, ob die verminderte Bildung dieses Metaboliten zu einer Abnahme der ODC-Hemmung in vivo führt. Zur Klärung dieser Frage wurden daher die Purine an 2 Versuchstagen 5 Stunden nach der Allopurinolesinnahme verabreicht, zu einem Zeitpunkt, an dem die Bildung von Allopurinol-Ribotid infolge der raschen Absorption, Metabolisierung und Ausscheidung von Allopurinol (vgl. Elion, 1978) bereits beendet ist. Aus dem Vergleich der Wirkung von gleichzeitiger und zeitversetzter Einnahme von Allopurinol und Purinen auf die Orotacid- und Orotidinurie sollte so Aufschluß über die Bedeutung von Allopurinol-Ribotid für die ODC-Hemmung in vivo gewonnen werden.

Die Ausscheidung von Oxipurinol-7-Ribosid, dem Abbauprodukt des starken ODC-Hemmers Oxipurinol-7-Ribotid ($K_i = 4 \times 10^{-8}M$, s.o.) konnte mit dem verwendeten HPLC-System nicht bestimmt werden.

III. MATERIALIEN UND METHODEN:

Als Chemikalien fanden, sofern nicht anders angegeben, analysen-reine Produkte der Fa. Merck (Darmstadt) Verwendung.

III. 1. VERSUCHSBEDINGUNGEN UND ABLAUF DES ERNÄHRUNGSVERSUCHS:

Versuch I: Einmalige morgendliche Gabe von Allopurinol und Purinen:

Acht gesunde Versuchspersonen im Alter zwischen 19 und 28 Jahren, davon jeweils vier männlichen und vier weiblichen Geschlechts, erhielten für die Dauer von insgesamt drei Wochen eine purinfreie Formeldiät (siehe III. 2.).

Größe, Gewicht und Körperoberfläche der einzelnen Probanden sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Während der gesamten Dauer des Versuchs wurde, jeweils von 7.00 morgens an, der 24 h-Urin gesammelt. Zur Konservierung dienten dabei 2 ml Toluol pro Literflasche.

Die Versuchspersonen waren gehalten, mindestens soviel Flüssigkeit zu sich zu nehmen, daß ein Harnvolumen von 1.500 ml/die nicht unterschritten wurde. Nach Messung des täglich ausgeschiedenen Volumens wurden Proben von ca. 50 ml Urin entnommen und tiefgefroren.

Vom siebten Versuchstag an wurden jeden Morgen zu Beginn der Sammelperiode 5 mmol Allopurinol pro $1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche verabreicht. Allopurinol wurde in Pulverform von der Fa. Wellcome, Großburgwedel, zur Verfügung gestellt.

Vom vierzehnten Versuchstag an nahmen die Versuchspersonen zusätzlich 7,5 mmol der verschiedenen Purinverbindungen pro $1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche und Tag zu sich (vgl. Tab. 2). Diese Purine wurden in pA-Qualität von der Fa. Sigma bezogen.

Die Einnahme erfolgte an den ersten beiden Tagen 5 h nach der Einnahme der täglichen Dosis Allopurinol, während der verbleibenden Tage gleichzeitig mit dieser.

Am sechzehnten Versuchstag, an dem erstmalig die Einnahme der Purindosis morgens gleichzeitig mit Allopurinol erfolgte, wurde der Urin in vier Fraktionen von 5 h, 4 h, 4 h und 11 h Dauer gesammelt.

Sowohl die GMP- als auch die Guanosindosis mußte allerdings von Tag 19 an auf zwei Drittel reduziert werden, da bei den Probanden Druckgefühl bzw. Schmerzen in der Nierengegend auftraten.

Versuch II: Gabe von Allopurinol und Purinen in drei über den Tag verteilten Portionen:

Zwei männliche und eine weibliche Versuchsperson erhielten zwei Wochen lang die purinfreie Formeldiät und sammelten während dieser Zeit ihren 24h-Urin. Während der gesamten Dauer des Versuchs erfolgte die Einnahme von 5 mmol Allopurinol pro $1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche in drei gleichen Portionen über den Tag verteilt.

In der zweiten Versuchswoche erhielten die Versuchspersonen zusätzlich 7,5 mmol der verschiedenen Purine (vgl. Tab. 3) pro $1,73 \text{ m}^2$ Körperoberfläche ebenfalls in drei gleichen Portionen über den Tag verteilt.

Tab. 2: Daten der Versuchspersonen sowie Dosierung von Purinen und Allopurinol in Versuch I.

M = männlich

G = Geschlecht

W = weiblich

K.O. = Körperoberfläche

Versuchs- person	Alter	G	Größe	Gew.	K.O.	verabreichtes Purin	Purin- menge	Allopurinol- menge
			cm	kg	m ²		mg	mg
1	28	M	190	76,5	2,04	Guanosin Tag 14 - 18 Tag 19 - 20	2.504,6 1.670,9	800
2	22	M	183	70	1,91	AMP	4.133,5	750
3	23	W	159	50	1,51	Inosin	1.755,7	600
4	19	W	177	75	1,92	Adenin	1.124,5	750
5	25	W	165	51	1,54	IMP	2.635,4	600
6	19	M	186	82	2,07	Adenosin	2.397,8	825
7	21	M	178	68	1,85	GMP Tag 14 - 18 Tag 19 - 20	3.987,7 2.635,2	725
8	22	W	175	60,5	1,73	Hypoxanthin	1.020,8	675

Tab. 3: Daten der Versuchspersonen sowie Dosierung von Purinen und Allopurinol in Versuch II.

Abkürzungen wie oben.

Versuchs- person	Alter	G	Größe	Gew.	K.O.	verabreichtes Purin	Purin- menge	Allopurinol- menge
			cm	kg	m ²		mg	mg
2	22	M	183	70	1,91	Adenin	1.118	750
9	22	M	190	70	1,96	Adenosin	2.270	775
8	22	W	175	60,5	1,73	AMP	2.603	675

III. 2. VERABREICHTE DIÄT:

III. 2.1. BERECHNUNG DES KALORIENBEDARFES:

Die Körperoberfläche der Versuchspersonen wurde aus dem von Dubois angegebenen Nomogramm (Documenta Geigy 1968) nach Gewicht und Körpergröße bestimmt.

Der Grundumsatz der Versuchspersonen ergibt sich sodann in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht und Körperoberfläche aus der Tabelle von Boothby (in Zöllner, 1957).

Der Arbeitsumsatz der einzelnen Probanden, die als Studenten beruflich keine körperliche Arbeit zu leisten hatten und für die Dauer des Versuchs jede größere körperliche Belastung auch im Sport vermieden, wurde durch Multiplikation mit dem Faktor 1,6 berechnet (nach Zöllner, 1957).

Der so ermittelte Arbeitsumsatz entspricht dem bei der Portionierung der Diät zu Grunde gelegten Kalorienbedarf.

Durch tägliche Kontrolle des Körpergewichts wurde überwacht, ob die den einzelnen Versuchspersonen nach diesen Berechnungen zugeteilte Kalorienmenge auch tatsächlich dem realen Umsatz entsprach.

Dies war bei allen Versuchspersonen der Fall, es traten während der gesamten Dauer des Versuchs keine Gewichtsveränderungen auf.

III. 2.2. ZUSAMMENSETZUNG DER DIÄT:

Der für die einzelnen Versuchspersonen errechnete Kalorienbedarf wurde zu 15 % durch Eiweiß, zu 30 % durch Fett und zu 55 % durch Kohlehydrate gedeckt.

Als Eiweißträger diente Magermilchsprühpulver (Bayr. Milchindustrie), als Hauptkohlehydratträger Maltodextrin (Maizena). Fett wurde in Form von Livio-Speiseöl zugesetzt.

Zur Verfestigung des Gemisches dieser Zutaten wurde Dr. Oetker-Puddingpulver zugegeben.

Magermilchpulver hat einen tatsächlichen Eiweißgehalt von 51 %.

Der Fettgehalt von Livio-Speiseöl beträgt 100 %.

Der Kohlehydratgehalt von Maltodextrin beträgt 97,5 %. Kohlehydrate sind aber außerdem im Magermilchpulver in Form von Laktose zu 36 % enthalten.

Zusätzlich besteht auch noch das Puddingpulver zu 87 % aus Kohlehydraten.

Unter Berücksichtigung dieser Werte wurden aus den physiologischen Brennwerten von 4,1 kcal/g für Kohlehydrate und Eiweiß sowie 9,3 kcal/g für Fett die benötigten Mengen der vier Zutaten für jede Versuchsperson errechnet.

25 % des Gesamtkohlehydratbedarfes wurden dabei durch Puddingpulver abgedeckt.

Die restlichen Kohlehydrate nach Abzug der Menge, die in der für die Deckung des Eiweißbedarfes erforderlichen Magermilchpulvermenge bereits enthalten ist, wurden in Form von Maltodextrin zugesetzt.

Die errechneten Mengen der Zutaten wurden mit 0,5 bis 0,75 l Wasser je nach Trockensubstanzmenge vermischt und gekocht.

Vitamine wurden in Form einer Kapsel Multibionta forte^R täglich zugeführt.

Die Versuchspersonen nahmen die Diät in drei gleichmäßig über den Tag verteilten Portionen zu sich.

Als Getränke waren Mineralwasser, Kaffee Haag und Kräutertee erlaubt. Nicht erlaubt waren Schwarztee und nicht entkoffeinierter Kaffee wegen des Gehaltes an Methylxanthinen, die bei den HPLC-Messungen stören.

Als Süßstoff diente Na-Cyclamat.

Keine Versuchsperson nahm während der Dauer des Versuchs zusätzlich irgendwelche Pharmaka ein.

Beispiel: Berechnung der Zusammensetzung der Diät für einen Kalorienbedarf von 1.000 kcal:

Von 1.000 kcal werden zugeführt:

150 kcal in Form von Eiweiß,

300 kcal in Form von Fett,

550 kcal in Form von Kohlehydraten.

Dem entspricht:

$$\text{eine Menge von } \frac{150 \text{ kcal}}{4,1 \text{ kcal}} \times \frac{1}{0,51} \text{ g} = 72 \text{ g Magermilchpulver,}$$

$$\text{eine Menge von } \frac{300 \text{ kcal}}{9,3 \text{ kcal}} \times 1 \text{ g} = 32 \text{ g Livio-Speiseöl,}$$

$$\text{eine Menge von } \frac{550 \text{ kcal}}{4,1 \text{ kcal}} \times 0,25 \times \frac{1}{0,87} = 36 \text{ g Puddingpulver.}$$

Die 72 g Magermilchpulver enthalten 36 % = 26 g Kohlehydrate.

Das entspricht 20 % des Gesamtkohlehydratbedarfes von $\frac{550}{4,1} \text{ g} = 134 \text{ g}$.

Die 36 g Puddingpulver enthalten rund 25 % des Gesamtkohlehydratbedarfes, also rund 33 g Kohlehydrate.

Es verbleibt ein Rest-Kohlehydratbedarf von $134 \text{ g} - (26 \text{ g} + 33 \text{ g}) = 75 \text{ g}$, der durch $75 \times \frac{1}{0,975} \text{ g} = 77 \text{ g}$ Maltodextrin abgedeckt wird.

III. 3. MESSMETHODEN:

III. 3.1. ENZYMATISCHE HARNSÄUREBESTIMMUNG:

Die enzymatische Bestimmung der Harnsäureausscheidung im Urin wurde nach der 1963 von Zöllner angegebenen Methode an einem Photometer Typ 25 der Fa. Beckman durchgeführt.

Die Methode beruht auf der photometrischen Messung des Extinktionsabfalls bei 293 nm, welcher infolge der Umwandlung von Harnsäure in Allantoin durch Uricase auftritt und der Harnsäurekonzentration direkt proportional ist.

Reagentien:

- Glycin/ NaOH-Puffer, Stammlösung, 0,66 M, pH 9,3
- Glycinpuffer-Gebrauchslösung:
Verdünnung der Stammlösung 1:10 mit Aqua dest.
- Uricase (Hersteller: Loevens Kemiske Fabrik, Ballerup, DK)
75U gelöst in 25 ml Glycinpuffergebrauchslösung.

Die Urinproben wurden bei 37 °Celsius im Wasserbad aufgetaut. Nach Auflösen vorhandener Niederschläge durch Schütteln, 15 minütigem Erwärmen bei 37 °C und erneutem Schütteln wurden jeweils 0,2 ml der Probe mit Glycinpuffer-Gebrauchslösung 1:125 verdünnt und zur Vermeidung der Oxydation von Harnsäure luftdicht verschlossen.

Ansätze zur Photometrie:

- Bestimmung der Eigenextinktion E_F des Enzyms:
1 ml Uricase Gebrauchslösung + 2 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung gegen 3 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung als Leerwert.
- Bestimmung des Extinktionsabfalls E im Urin:

2 ml verdünnter Urin + 1 ml Glycinpuffer-Gebrauchslösung gegen
2 ml verdünnten Urin + 1 ml Uricase-Gebrauchslösung.

Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt.

Der molare Extinktionskoeffizient von Harnsäure beträgt in Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke 12.600.

Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren berechnet sich die Harnsäurekonzentration in der Probe wie folgt:

$$HS_{\text{urin}} = (E_f + E) \times 250 \text{ mg/ml.}$$

III. 3.2. DURCHFÜHRUNG DER HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHISCHEN MESSUNGEN:

Die hochdruckflüssigkeitschromatographische Bestimmung der renalen Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin, Hypoxanthin, Xanthin, Allopurinol und seinen Metaboliten Oxipurinol und Allopurinol-1-Ribosid wurde mit einem Hewlett-Packard-Gerät 1084 B durchgeführt. Dieses Gerät ist u.a. mit einem Spektralphotometer, einem Säulenofen, einer Probenschleife für 60 Proben, einem automatischen Injektor und einem Integrator zur vollautomatischen Probenanalyse ausgerüstet. Zur Herstellung der Elutionspuffer wurde destilliertes Wasser Muldestor verwendet, das aus der Klinikapotheke bezogen wurde. Die pH-Einstellung der Puffer wurde an einem pH-Meter 26 der Firma Radiometer, Copenhagen, vorgenommen. Vor Gebrauch wurden die Puffer über einen Tuffryn Membrane Filter HT-450, Porengröße 0,45 µm, der Firma Gelman in einem Ganzglas-Filtrationsgerät der Firma Millipore abfiltriert. Die Analysen wurden mit zwei unterschiedlichen isokratischen Trennsystemen ausgeführt:

- Das Umkehrphasensystem (nach Reiter et al., 1983):

Das Umkehrphasensystem trennt Basen und Nukleoside an einer stationären Phase von Kohlenwasserstoffketten, die an Kieselgelpartikel gebunden sind.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode benützt eine stationäre Phase mit einer Kohlenwasserstoff-Kettenlänge von 8 C-Atomen, die eine isokratische Auftrennung von Harnsäure, Hypoxanthin, Xanthin sowie Allopurinol und seinen Metaboliten mit Phosphatpuffer erlaubt. Als Trennsäule wurde eine Chrompack RP-8 Fertigsäule mit 25 cm Länge und 4,6 mm innerem Durchmesser, unregelmäßiger Partikelform und einer durchschnittlichen Partikelgröße von 0,01 mm eingesetzt. Der Elutionspuffer bestand aus 1 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Suprapur), er wurde mit konzentrierter Phosphorsäure (Merck, Suprapur) auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt. Zur Bestimmung von unmetabolisiertem Adenin bei Versuchsperson 4 in Versuch I bzw. Versuchsperson 2 in Versuch II wurde der Phosphatpuffer mit Natronlauge auf pH 5,5 eingestellt und mit 20 % Methanol versetzt. Die Flußrate betrug jeweils 1 ml pro Minute. Das Eluat wurde bei 260 nm im Durchflußphotometer photometriert, wobei die Attenuation auf 2^6 und die Slope Sensitivity auf 0,1 eingestellt waren. Das Injektions-Volumen betrug 0,05 ml.

- Das Ionen-Paar-System (nach Voelter et al., 1980):

Orotsäure und Orotidin haben als anionische, polare Substanzen nur eine geringe Affinität zur stationären Kohlenwasserstoffphase des Umkehrphasensystems und weisen daher sehr kurze Retentionszeiten und infolgedessen eine ungenügende Trennung auf. Ihre Retentionszeit auf der Säule kann durch Zugabe des seifenartigen Kohlenwasserstoff-Kations Tetrabutylammonium (phosphat) zum Elutionspuffer beliebig verlängert werden: Tetrabutylammonium (phosphat) hat durch seine Butylreste eine hohe Affinität zur stationären Kohlenwasserstoffphase des Säulenfüllmaterials und kann mit seinem Ammoniumrest die Anionen Orotsäure und Orotidin binden. Die Umkehrphasensäule bekommt hierdurch Ähnlichkeit mit einer Anionenaustauschersäule; das Ionenpaarsystem ist jedoch wesentlich variabler als ein Anionenaustauschersystem mit fest gebundenen Kationen, da seine Trennleistung außer von pH-Wert und Salzkonzentration des Puffers auch noch von Konzentration und Mobilität des Tetrabutylam-

monium (phosphats) abhängt. Letztere läßt sich durch den Methanol- und Salzgehalt des Elutionspuffers sowie durch die Säulentemperatur beeinflussen.

Bei den vorliegenden Untersuchungen wurde die Trennsäule Beckman Ultrasphere-IP mit einer Länge von 25 cm und einem inneren Durchmesser von 4,6 mm verwendet; sie besteht aus sphärischen Kieselgelpartikeln, die mit Kohlenwasserstoffketten von 18 C-Atomen (ODS) vollständig abgedeckt sind. Tetrabutylammoniumphosphat wurde in gelöster Form (0,5 M in Phosphat-Puffer pH 7,5) ebenfalls von Beckman bezogen und dem Elutionspuffer in einer Endkonzentration von 2,5 mM zugesetzt (5 ml/l); der Elutionspuffer enthielt außerdem 15 ml/l 2 M Essigsäure entsprechend einer Endkonzentration von 30 mM und 2 % Methanol; er wurde mit 1 n Natronlauge auf einen pH-Wert von 4 eingestellt.

Die Flußrate betrug 1,5 ml/Min, die Ofentemperatur 35°, das Injektionsvolumen 0,1 ml. Das Eluat wurde bei 280 nm im Durchflußphotometer photometriert, die Attenuation war auf 2^5 , die Slope Sensitivity auf 0,1 eingestellt.

Vor der Analyse der Urinprobe wurden Mischungen von Standardlösungen chromatographiert, deren Konzentrationen photometrisch bestimmt wurden:

Standardmischung für das Umkehrphasensystem:

Mit dem Umkehrphasensystem sollten Hypoxanthin, Xanthin, Oxipurinol, Allopurinol und Allopurinolribosid bestimmt werden. Oxipurinol-7-ribosid konnte mit diesem System nicht quantifiziert werden, da es in einem späten, breitbasigen Mischpeak eluiert wird. Stammlösungen der genannten Substanzen wurden hergestellt, indem jeweils 10 mg in 50 ml 0,01 n Natronlauge aufgelöst wurden.

Die Referenzsubstanzen Allopurinol und Oxipurinol wurden von der Firma Wellcome, Burgwedel, Allopurinol-1-Ribosid und Oxipurinol-7-Ribosid von der Firma Henning, Berlin, zur Verfügung gestellt; Hypoxanthin und Xanthin wurden von der Firma Sigma bezogen.

Die exakte Konzentration der Stammlösungen wurde photometrisch bestimmt: von jeder Stammlösung wurden drei Verdünnungen 1:41 (0,05 ml + 2 ml) mit Phosphatpuffer (10 g/l NaH_2PO_4) unterschiedlichen pH-Werts hergestellt und bei der Wellenlänge der maximalen Extinktion gegen den jeweiligen Puffer im Beckman-Photometer Typ 25 photometriert. Der Mittelwert der erhaltenen Extinktionswerte wurde sodann durch den molaren dekadischen Extinktionskoeffizienten dividiert und mit 41 multipliziert, wonach man die Konzentration in mmol/l erhält. Die verwendeten pH-Werte, Wellenlängen und Extinktionskoeffizienten sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tab. 4: Daten zur Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen:

Substanz	pH-Wert	Wellenlänge nm	Extinktionskoeffizient
Hypoxanthin	1	248	10.800 (Rauen, 1964)
Xanthin	2	267	10.200 (Rauen, 1964)
Oxipurinol	1	252	6.050 (Elion et al., 1966)
Allopurinol	1	250	7.750 (Elion et al., 1966)
Allopurinol- 1-Ribosid	3	251	8.350 (Krenitsky et al., 1967)

Aus diesen Stammlösungen wurde eine Standardmischung für die HPLC folgendermaßen hergestellt: jeweils 0,1 ml Xanthin-, Oxipurinol- und Allopurinol-Stammlösung wurden mit je 0,05 ml Hypoxanthin- und Allopurinolribosid-Stammlösung vereinigt; zur sicheren Identifizierung des Harnsäurepeaks wurden noch 0,2 ml einer Harnsäurestammlösung (10 mg in 50 ml 0,01 n NaOH) zugesetzt; das Gemisch wurde sodann mit 2 ml einer NaCl-Lösung (15 g/l) in 0,04 n HCl auf ein Endvolumen von 2,6 ml verdünnt.

Standardmischungen für das Ionenpaar-System:

Für die Standardmischung wurden zunächst wässrige Stammlösungen mit einer Konzentration von 2,5 mg/10 ml Orotsäure (Mononatriumsalz, MGW 178,1; Sigma) und 8 mg/10 ml Orotidin (Cyclohexylammoniumsalz, MGW 385,4; Calbiochem) hergestellt.

Die exakte Konzentration dieser Stammlösungen wurde wie oben beschrieben photometrisch bestimmt; die hierzu benötigten Daten (Fasman, 1975) sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt. Zur pH-Einstellung bzw. Verdünnung der Standardlösungen wurde 0,1 n HCl verwendet, womit pH 1 erhalten wird.

Tab. 5: Daten zur Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen:

Substanz	Stammlösung mg/10 ml	Photometrische Verdünnung mit 0,1 n HCl	Konzentrationsbestimmung Wellenlänge nm	Extinktions- koeffizient
Orotsäure	2,5	1:41	280	7.500
Orotidin	8,0	1:101	267	9.800

Jeweils 0,025 ml der Stammlösungen von Orotsäure und Orotidin wurden vereinigt mit 2,5 ml 30 mM Na-Acetat-Puffer pH 4 (s.o.) zur Standardmischung für die HPLC verdünnt.

Nach Chromatographie der Standardmischung für das Umkehrphasen- oder Ionenpaar-System wurde der Integrator durch Eingabe der den einzelnen Peakflächen entsprechenden Substratkonzentrationen kalibriert.

Die Urinproben mußten vor der HPLC-Analyse je nach verwendetem Trennsystem unterschiedlich vorbereitet werden:

Probenvorbereitung für das Umkehrphasensystem:

Im Umkehrphasensystem läßt sich Allopurinol-1-Ribosid nicht ausreichend von N-Methylpyridon-carbonsäureamid trennen, einem methylierten und oxydierten Abbauprodukt des Nicotinamids, das normalerweise täglich in einer Menge von 15 - 40 mg im Urin ausgeschieden wird (Fasman 1975). Dieser Metabolit kann durch Anionenaustauscherchromatographie von den Purinen sowie von Allopurinol und seinen Metaboliten abgetrennt werden: Hierzu wurde der Anionenaustauscher AG 1X8, 200-400 mesh, Acetat-Form der Firma Bio-Rad verwendet. Das Gel wurde zunächst in destilliertem Wasser vorgequollen und dann auf Quarzwolle in Pateur-

pipetten bis zu einer Füllhöhe von 2 cm gepackt. Die Urinproben wurden im Wasserbad bei 37° aufgetaut, anschließend 15 Minuten weiter erwärmt und mehrmals kräftig geschüttelt. Von jeder Probe wurde sodann 1 ml in ein Reagenzglas pipettiert. Proben von 24-Stunden-Urinen, deren Volumen weniger als 1,5l betrug, wurden um den Faktor 24-Std.-Vol. in 1 mit destilliertem Wasser

1,5 l

verdünnt. Die Urinproben wurden nun mit ca. 0,05 ml 1n NaOH auf pH 10 gebracht, um die Purine sowie Allopurinol und seine Metaboliten in die Anionenform überzuführen. Nach einer 5minütigen Zentrifugation bei 3000 U/Min in einer Digifuge der Firma Heraeus zur Abtrennung unlöslicher Phosphate wurden jeweils 0,4 ml einer Urinprobe auf ein Ionenaustauschersäulchen aufgebracht. Dieses wurde zunächst mit zweimal 1 ml destillierten Wassers eluiert; dieses erste Eluat enthält quantitativ N-Methyl-pyridon-carbonsäureamid. Anschließend wurden die Säulchen mit sechsmal 1 ml einer Lösung von 15 g/l NaCl in 0,04 n HCl eluiert; dieses zweite Eluat enthält die Purinmetaboliten sowie Allopurinol und seine Metaboliten in einer Recovery von annähernd 100 %. Durch die Anionenaustauscher-Vortrennung tritt somit eine Probenverdünnung von 1:15 ein.

Die Ionenaustauschersäulchen wurden vor der erneuten Verwendung nach folgendem Elutionsschema regeneriert:

1. 1 ml dest. Wasser
2. 10 ml 1n Natronlauge
3. 5 ml dest. Wasser
4. 4 ml 2 M Essigsäure
5. 10 ml dest. Wasser

Probenvorbereitung für das Ionenpaarsystem:

Zum Schutz der HPLC-Trennsäule vor Urinbestandteilen, die sich irreversibel an das Säulenfüllmaterial binden, wurden die Urinproben an Sep-Pak C 18-Kartuschen der Firma Waters vorgereinigt. Diese Kartuschen enthalten ein kleines Volumen eines Füllmaterials, das dem der analytischen Säule sehr ähnlich ist. Sie müssen vor Aufbringen der Urinprobe mit 2 ml Methanol und so-

dann mit 10 ml dest. Wassers gespült werden, da das Trennmaterial sonst nicht benetzbar ist. Je 1 ml der aufgetauten und erwärmten (s.o.) Urinproben wurde nun langsam durch je eine Kartusche in ein Reagenzglas gespritzt. Orotsäure und Orotidin wurden sodann mit 4 ml 30 mM Acetatpuffer pH 4 (s.o.), die langsam durch die Kartusche gespritzt wurden, in das gleiche Reagenzglas quantitativ eluiert. Durch die Vorreinigung der Urinprobe an Sep-Pak Kartuschen kommt es somit zu einer Probenverdünnung von 1:5.

Jeweils 0,2 ml der mittels Anionenaustauschersäulchen oder Sep-Pak Kartuschen vorbereiteten Proben wurden nun in ein Probenfläschchen aus Polypropylen pipettiert, das von der Firma Weidmann-Plastic, Romanshorn, bezogen wurde.

Für die einzelnen Proben wurde sodann der aus der Probenvorbereitung und dem 24-Stunden-Urinvolumen resultierende "Verdünnungsfaktor" berechnet und in den Integrator eingegeben. Die hiernach durchgeführte vollautomatische Probenanalyse liefert die Ausscheidung der einzelnen Metaboliten in mmol/die.

IV. ERGEBNISSE

IV. 1. EINFLUSS VON NAHRUNGSPURINEN AUF DIE ALLOPURINOL-INDUZIERTER OROTAZIDURIE UND OROTIDINURIE

IV. 1. 1. TRENNLEISTUNG, RECOVERY, LINEARITÄT UND REPRODUZIERBAR- KEIT DER IONENPAAR-HPLC-METHODE ZUR BESTIMMUNG VON OROT- SÄURE UND OROTIDIN

Das Ergebnis der photometrischen Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen sowie das HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Ionenpaar-System sind in Abb. 3 wiedergegeben:

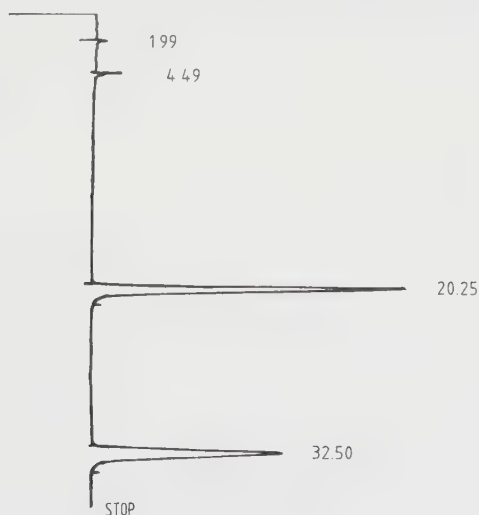


Abb. 3: HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Ionenpaar-system, Injektions-Volumen 0,1 ml. Flußrate 1,5 ml/min. Ofen-Temperatur 35°. Wellenlänge 280 nm, Attenuation 2⁵. Slope Sensi-tivity 0,1. Papiervorschub 0,25 cm/min.

Substanz	Konzentration (mM) Stammlösung	Standardmischungen	Retentionszeit (min)
Orotidin	2,080	0,0204	20,25
Orotsäure	1,449	0,0142	32,50

Orotsäure und Orotidin sind, wie aus Abb. 3 ersichtlich, weit voneinander getrennt. Wie das Chromatogramm eines Urins aus der 1. Versuchsperiode zeigt (Abb. 4), finden sich im normalen Urin nur sehr kleine Peaks mit der Retentionszeit von Orotsäure und Orotidin, entsprechend der geringen Basalausscheidung dieser Metaboliten.

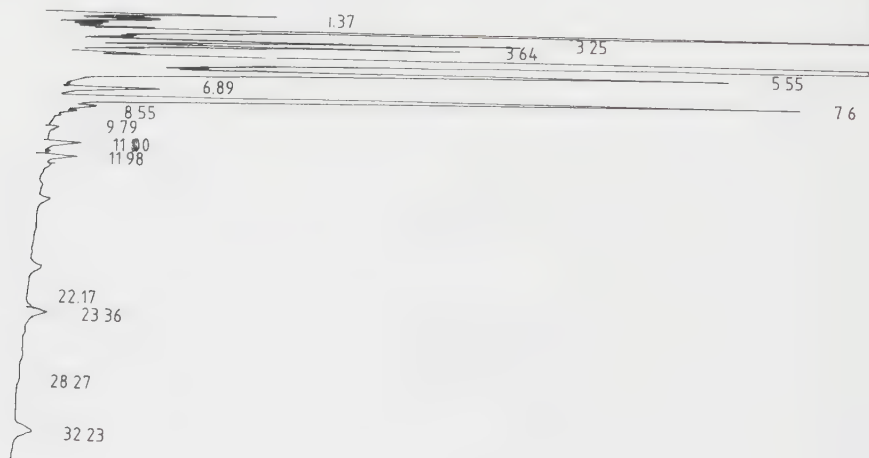


Abb. 4: HPLC-Chromatogramm des Urins (Verdünnung 1:5 durch Vorreinigung) vom 6. Versuchstag (letzter Tag vor Beginn der Allopurinol-Einnahme) von Versuchsperson 8 im 1. Versuch. Bedingungen wie in Abb. 3.

Nach Gabe von Allopurinol kam es zu einem deutlichen Anstieg der Orotsäure- und Orotidinausscheidung, der durch Purinzulage wieder reduziert wurde. Keines der verabreichten Purine führte zum Auftreten von Peaks, die mit dem Orotsäure- oder Orotidinpeak inter-

feriert hätten. Als Beispiel ist in Abb.5 das HPLC-Chromatogramm eines Urins von Versuchsperson 8 unter Einnahme von Hypoxanthin wiedergegeben.

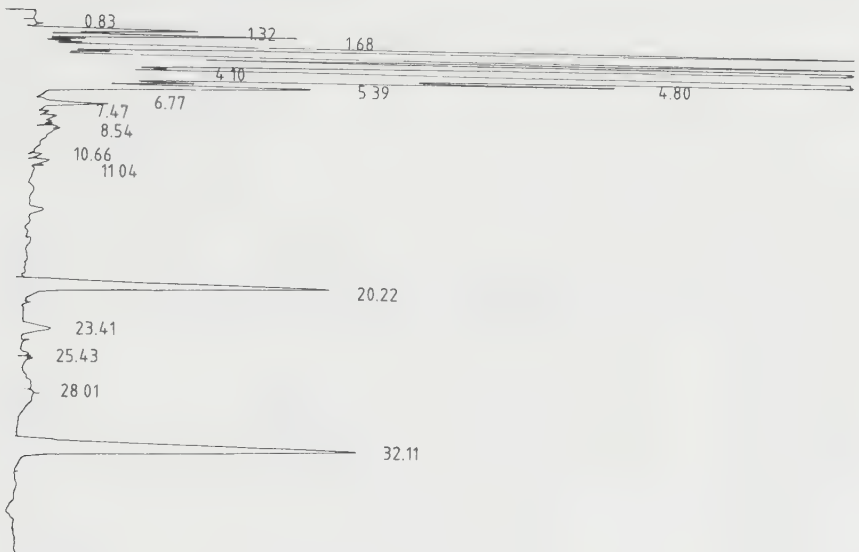


Abb. 5: HPLC-Chromatogramm des Urins (Verdünnung 1:5 durch Vorreinigung) vom 20. Versuchstag (Einnahme von 675 mg/die Allopurinol und 1.021 mg/die Hypoxanthin) von Versuchsperson 8 im 1. Versuch. Bedingungen wie Abb. 3. Peakidentifizierung: Orotidin (20.22), Orotsäure (32.11).

Die Recovery von Orotsäure und Orotidin bei der Vorreinigung des Urins mittels Sep-Pak-C18-Kartuschen war vollständig, was folgendermaßen nachgewiesen wurde:

1,125 ml Orotsäure- bzw. Orotidinlösung steigender Konzentration wurden einerseits auf die Kartuschen aufgegeben und mit 4 ml Acetatpuffer eluiert, andererseits unmittelbar mit 4 ml Acetatpuffer verdünnt.

Jeweils 0,05 ml der Eluate und Verdünnungen wurden im HPLC-System chromatographiert.

Tabelle 6 zeigt die gemessenen Peakflächen.

Ein Vergleich der Flächenmeßzahlen der Orotsäurepeaks untereinander und der Orotidinpeaks untereinander ergibt über den zu erwartenden Konzentrationsbereich (s.o.) eine Recovery von 98,7 bis 99,8 %.

Tab. 6: Recovery von Orotsäure und Orotidin bei Vortrennung auf Sep-Pak-C18-Kartuschen (Angabe der Peakflächen in Flächenmeßzahlen).

Konzentration der Lösung	Peakfläche Verdünnung	Peakfläche Eluat (Sep-Pak)	Recovery
<u>OROTIDIN:</u>			
0,07 mM	47.560	47.500	99 %
0,14 mM	91.160	90.520	99 %
0,21 mM	143.100	141.620	99 %
0,28 mM	200.600	198.520	99 %
<u>OROTSÄURE:</u>			
0,03 mM	27.660	27.540	99,5 %
0,06 mM	55.500	54.890	98,9 %
0,09 mM	84.200	83.160	98,7 %
0,12 mM	111.300	112.820	99,8 %

IV. 1.1.2. Linearität der Bestimmung von Orotsäure und Orotidin
mittels Ionen-Paar-HPLC:

Wie in Abb. 6 dargestellt, sind die in Tab. 6 angegebenen Peakflächen der Verdünnungsreihen von Orotsäure und Orotidin mit der Konzentration der Ausgangslösungen linear korreliert:

IV. 1.1.3. Reproduzierbarkeit der Orotsäure- und Orotidinbestimmung im Urin mittels Ionenpaar-HPLC:

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der Methode wurde die

Orotsäure- und Orotidinbestimmung im Urin einer Versuchsperson
fünfmal durchgeführt, wobei die folgenden Peakflächen in Flächen-
einheiten gemessen wurden:

<u>OROTIDIN:</u>	<u>OROTSÄURE:</u>
112.100	335.500
115.380	333.100
113.900	348.800
112.200	335.800
111.800	336.200

Daraus ergibt sich eine Standardabweichung der Meßwerte von 1.530
für Orotidin und von 6.223 für Orotsäure.

Das entspricht einer Streuung von $\pm 1,4$ % des Mittelwertes für
Orotidin und $\pm 1,8$ % des Mittelwertes für Orotsäure.

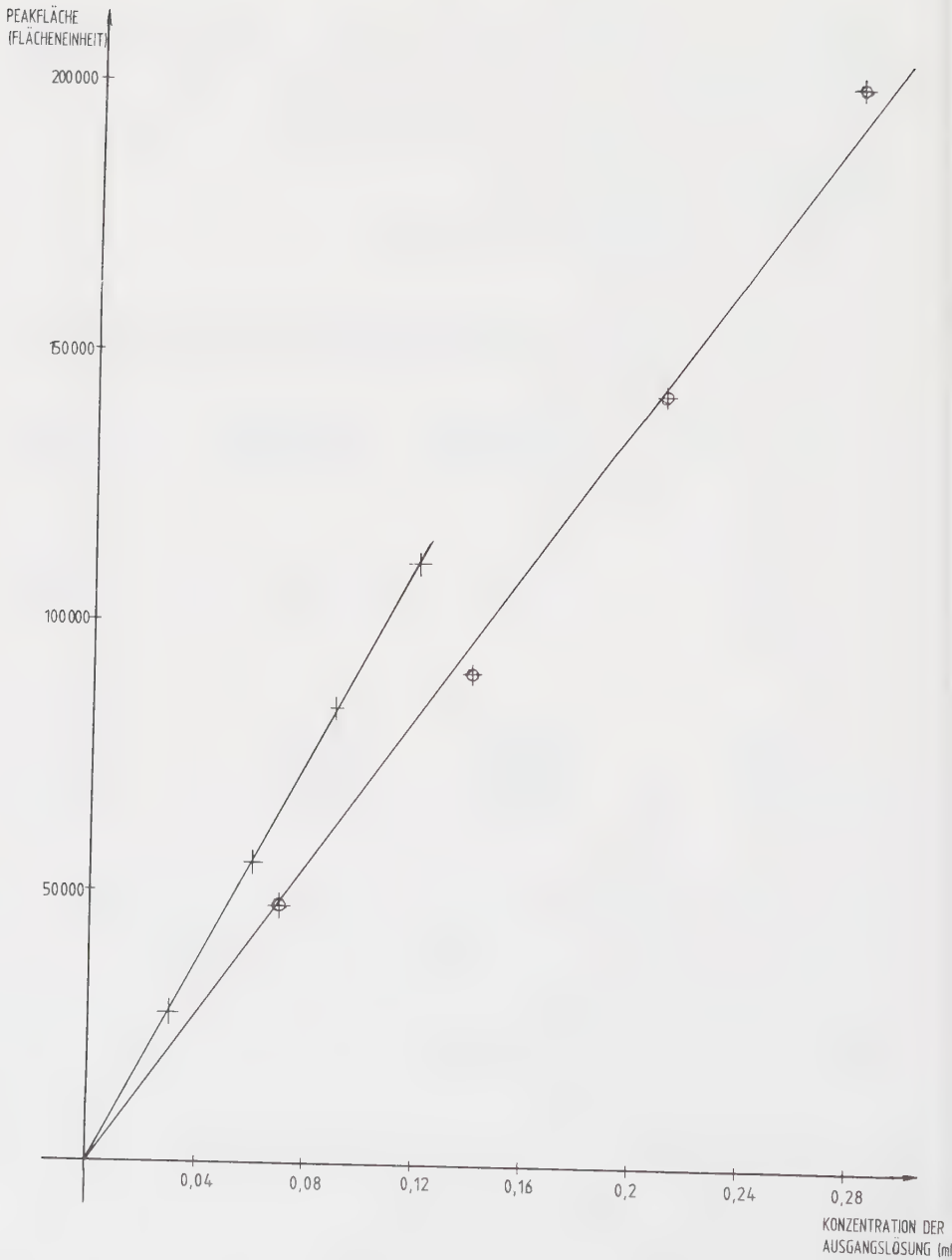


Abb. 6: Linearität der Bestimmung von Orotsäure und Orotidin mittels Ionen-Paar-HPLC.

⊕⊕: Orotidin, +—+: Orotsäure

IV. 1.2. OROTACID- UND OROTIDINURIE UNTER ALLOPURINOLEINNAHME

Die basale Orotsäure- und Orotidinausscheidung/24 Stunden wurde in Versuch I am 6. Versuchstag bestimmt. Die Werte der einzelnen Versuchspersonen sind in Tabelle 7 aufgeführt. Aus ihnen läßt sich eine durchschnittliche Orotsäureausscheidung von 6,2 $\mu\text{mol/die}$ (3,2-10,9) bzw. 1 mg/die (0,5-1,7) und eine durchschnittliche Orotidinausscheidung von 8,2 $\mu\text{mol/die}$ (2,8-11,4) bzw. 2,4 mg/die (0,8-3,3) berechnen.

Tab. 7: Basale Orotsäure- und Orotidinausscheidung vor Beginn der Allopurinoleinnahme (Versuch I, Tag 6) in $\mu\text{mol/die}$.

<u>Versuchsperson</u>	<u>Orotsäure</u>	<u>Orotidin</u>
1	3,7	9,5
2	5,8	9,9
3	3,3	4,7
4	3,2	2,8
5	8,7	11,0
6	5,6	11,0
7	8,1	11,4
8	10,9	5,5

Die täglichen Ausscheidungswerte von Orotsäure und Orotidin während der 2. und 3. Versuchsperiode sind für die einzelnen Versuchspersonen in Tabelle 9 und 10 wiedergegeben. Zur Bestimmung des Einflusses von Nahrungspurinen auf die Allopurinol-induzierte Orotazidurie muß für die einzelnen Versuchspersonen die Differenz zwischen der durchschnittlichen Orotsäure- und Orotidinausscheidung der 2. und 3. Versuchsperiode ermittelt werden:

Betrachtet man die Ausscheidungswerte der **2. Versuchsperiode**, so erkennt man, daß sich der Anstieg der Orotsäure- und Orotidinausscheidung bei den meisten Versuchspersonen vom ersten bis zum vierten Tag der Allopurinoleinnahme (7.- 10. Versuchstag) fort-

setzt; an den restlichen Tagen der 2. Versuchsperiode findet z.T. wieder ein Rückgang der Ausscheidungswerte statt (vgl. Orotsäureausscheidung von Versuchsperson 2, 4 und 6 sowie Orotidinausscheidung von Versuchsperson 4 in Versuch I), so daß hier kein echter Gleichgewichtswert erreicht wird. Dieser Verlauf der Orotsäure- und der Orotidinausscheidung war in Versuch I und II zu beobachten und läßt sich gut an den über alle Versuchspersonen gemittelten Ausscheidungswerten der einzelnen Versuchstage ablesen, die in der folgenden Tab. 8 aufgeführt sind:

Tab. 8: Über alle Versuchspersonen gemittelte Orotsäure (OS)- und Orotidin (OT)- Ausscheidung an den einzelnen Versuchstagen der 2. Versuchsperiode (purinfreie Kost + Allopurinol) in $\mu\text{mol}/\text{die}$.

Versuchstag:		7	8	9	10	11	12	13
Versuch I (n=8)	OS	98	194	247	306	297	290	223
	OT	98	148	189	246	229	242	226
Versuch II (n=3)	OS	113	290	377	372	352	339	336
	OT	126	214	334	324	300	320	339

Aufgrund des aus Tab. 8 hervorgehenden eindeutigen Anstiegs der über alle Versuchspersonen gemittelten Orotsäure- und Orotidinausscheidung während der ersten (3-) 4 Tage der Allopurinoleinnahme (7. bis 9./10. Versuchstag) wurde die durchschnittliche Orotsäure- und Orotidinausscheidung der einzelnen Versuchspersonen während der 2. Versuchsperiode aus den Werten des 10. bis 13. Versuchstags berechnet; die entsprechenden Werte finden sich in der letzten Spalte von Tab. 9. Die Höhe dieser Durchschnittswerte ist nicht mit der Allopurinol-Absolutdosis korreliert (vgl. z.B. die Versuchspersonen 6 und 8 in Versuch I). Bei den Versuchspersonen 2 und 3 übersteigt die Orotidinausscheidung die Orotsäureausscheidung, bei den übrigen Versuchspersonen ist das Verhältnis umgekehrt; die Relation Orotsäure- zu Orotidin-Ausscheidung beträgt durchschnittlich 1,19 (0,71-2,13).

Tab. 10: Orotsäure- (OS) und Orotidin- (OT) Ausscheidung während der 3. Versuchsperiode (purinfreie Diät und Allopurinol (wie in Tab. 9) und Purinzulage als Einzeldosis (Versuch I) oder in 3 verteilten Dosen (Versuch II)).

Versuchs- person		Purinzulage (mmol/die)	Orotsäure- Tag: 14	(OS) 15	und Orotidin- 16	(OT) 17	Ausscheidung (μmol/die) 18	19	20	Ø Tag 14 - 20
Versuch I										
1	Tag 14-18: Tag 19/20:	Guanosin 1 x 8,8	OS 144	228	224	236	248	224	177	201 (19 - 20)
		1 x 5,9	OT 158	310	312	344	355	344	355	350 (19 - 20)
2		AMP 1 x 8,3	OS 127	165	203	197	203	90	131	159
			OT 165	177	191	181	210	173	174	182
3		Inosin 1 x 6,5	OS 91	79	130	165	149	87	51	107
			OT 120	120	130	144	156	133	120	132
4		Adenin 1 x 8,3	OS 165	238	188	270	274	329	179	235
			OT 118	133	127	143	147	159	103	133
5		IMP 1 x 6,7	OS 175	204	221	(465)	316	209	146	212 (ohne Tag 17)
			OT 155	138	137	(351)	177	127	126	143 (" "

Der unterschiedliche Einnahmemodus von Allopurinol in Versuch I (Einzeldosis) und II (3 Teildosen) hatte keinen eindeutigen Effekt auf die Orotazidurie: bei Versuchsperson 2 nahmen Orotsäure- (+ 30,6 %) und Orotidinausscheidung (+ 62,7 %) zu, bei Versuchsperson 8 nahm nur die Orotidinausscheidung zu (+ 18 %), die Orotsäureausscheidung ging dagegen zurück (-23, 7 %).

Die über Versuch I und II gemittelte Orotsäureausscheidung erreichte mit 300 $\mu\text{mol}/\text{die}$ (106-497) bzw. 47 mg/die das 42,3 fache der durchschnittlichen Basalausscheidung, die Orotidinausscheidung mit 253 $\mu\text{mol}/\text{die}$ (130-371) bzw. 73 mg/die (entsprechend 40 mg Orotsäure) das 26,1fache.

Die Purinzulage während der **3. Versuchsperiode** erfolgte in Versuch I an den beiden ersten Tagen (14. und 15. Versuchstag) fünf Stunden nach der Allopurinoleinnahme, an den übrigen Tagen gleichzeitig mit der Allopurinoleinnahme. Bei Betrachtung sowohl der täglichen Einzelwerte (Tab. 10) als auch der über alle VP gemittelten Werte (Tab. 11) zeigt sich, daß die Abnahme der Orotsäure- und Orotidinausscheidung bereits am ersten Tag der Purineinnahme (14. Versuchstag) auftritt, während der gesamten Dauer der 3. Versuchsperiode annähernd konstant ist (Ausnahme: Versuchsperson 6 mit einem kontinuierlichen Anstieg der Orotsäure- und Orotidinausscheidung) und bei 5 Stunden nach Allopurinoleinnahme erfolgter Puringabe (14. und 15. Versuchstag) mindestens ebenso groß ist wie bei gleichzeitiger Puringabe (16. - 20. Versuchstag).

Tab. 11: Über alle Versuchspersonen gemittelte Orotsäure (OS)- und Orotidin (OT)- Ausscheidung an den einzelnen Versuchstagen der 3. Versuchsperiode (purinfreie Kost + Allopurinol + Purinzulage) in $\mu\text{mol}/\text{die}$.

Versuchstag:		14	15	16	17	18	19	20
Versuch I	OS	147	204	210	216	235	212	167
	OT	170	206	207	231	225	211	215
Versuch II	OS	204	184	231	230	193	141	189
	OT	228	188	217	186	190	159	191

Die durchschnittliche Orotsäure- und Orotidinausscheidung der einzelnen Versuchspersonen während der 3. Versuchsperiode wurde daher über alle Tage dieses Versuchsabschnitts (14 - 20. Versuchstag) berechnet, im Falle von Guanosin und GMP wurden aufgrund der Dosisreduktion um 1/3 an den Versuchstagen 19 und 20 nur diese beiden Tage zur Durchschnittsberechnung herangezogen. Diese Durchschnittswerte sind in der letzten Spalte von Tab. 10 aufgeführt.

Die absolute und prozentuale Veränderung der durchschnittlichen Orotsäure- und Orotidinausscheidung während der 3. Versuchsperiode gegenüber der 2. Versuchsperiode ist für die einzelnen Versuchspersonen in der folgenden Tabelle 12 angegeben. In dieser Tabelle ist außerdem die Abnahme des Summenwerts der Orotsäure- und Orotidinausscheidung aufgeführt, um einen Vergleich dieser Ergebnisse mit früheren Untersuchungen zu ermöglichen (vgl. Tab.1).

Tab. 12: Absolute ($\mu\text{mol}/\text{die}$) und prozentuale Veränderung der durchschnittlichen Orotsäure- und Orotidinausscheidung während der 3. Versuchsperiode (purinfreie Kost + Allopurinol + Purinzulage) gegenüber der 2. Versuchsperiode (purinfreie Kost + Allopurinol).

Versuchs- person	verabreich- tes Purin	Veränderung der Ausscheidung von					
		Orotsäure		Orotidin		Orotsäure + Orotidin	
Versuch I							
1	Guanosin	-146	-42 %	+ 72	+26 %	- 75	-12 %
2	AMP	- 40	-20 %	- 54	-23 %	- 94	-22 %
3	Inosin	+ 1	+ 1 %	- 18	-12 %	- 17	- 7 %
4	Adenin	- 11	- 4 %	- 44	-25 %	- 55	-13 %
5	IMP	- 62	-23 %	- 48	-25 %	-110	-24 %
6	Adenosin	- 19	- 7 %	+ 13	+ 5 %	- 6	- 1 %
7	GMP	-263	-85 %	-108	-34 %	-371	-59 %
8	Hypoxanthin	-178	-37 %	- 40	-17 %	-218	-30 %
Versuch II							
2	Adenin	- 96	-41 %	-164	-52 %	-260	-47 %
8	AMP	- 71	-19 %	- 70	-25 %	-141	-22 %
9	Adenosin	-292	-65 %	-146	-39 %	-438	-53 %

Abgesehen von Versuchsperson 6 findet sich bei allen Versuchspersonen eine Abnahme der Allopurinol-induzierten Orotazidurie und Orotidinurie (s. letzte Spalte von Tabelle 12) nach Purinzulage zur Diät. Dieser Rückgang der Orotazid- und Orotidinurie war in Versuch I besonders ausgeprägt nach Zulage von GMP (-59 %) und Hypoxanthin (-30 %). AMP hatte in Versuch I und II den gleichen Effekt (-22 %). Adenin (-13 %) und Adenosin (-1 %) waren in Versuch I wenig wirksam, führten jedoch bei verteilter Gabe in Versuch II zu einer starken Abnahme der Orotazid- und Orotidinurie (-47 % bzw. -53 %).

An der Abnahme der Allopurinol-induzierten Orotazid- und Orotidinurie waren Orotsäure- und Orotidinausscheidung in unterschiedlichem Ausmaß beteiligt: zu einer stärkeren Abnahme der Orotsäureausscheidung führten Guanosin, GMP, Hypoxanthin, Inosin in Versuch I sowie Adenosin in Versuch II; eine prozentual stärkere Abnahme der Orotidinausscheidung bewirkten AMP und Adenin in Versuch I und II; bei IMP nahmen in Versuch I Orotsäure- und Orotidinausscheidung gleichermaßen ab. Ein unerwarteter Befund ist die Zunahme der Orotidinausscheidung unter Einnahme von Guanosin und Adenosin in Versuch I.

Infolge der unterschiedlichen Abnahme der Orotsäure- und Orotidinausscheidung verschob sich bei einigen Versuchspersonen das Verhältnis dieser Metaboliten im Urin: bei den Versuchspersonen 1 (1,25 - 0,57), 7 (0,98 - 0,22) und 9 (1,21 - 0,64) nahm das Verhältnis der Orotsäure- zur Orotidinausscheidung zum Teil um mehr als die Hälfte ab, bei den übrigen Versuchspersonen kam es nur zu relativ geringfügigen Veränderungen gegenüber der 2. Versuchsperiode.

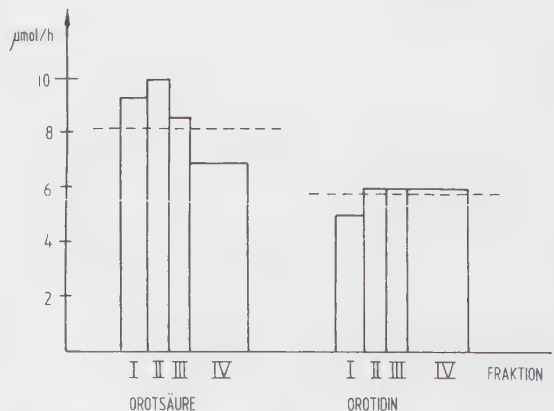
Anhaltspunkte für die eingangs dargelegten Mechanismen, durch die Nahrungspurine die Allopurinol-induzierte Orotazid- und Orotidinurie reduzieren könnten, sollten nicht nur durch Korrelation der 24-Stunden-Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin mit der von Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure bzw. der Allopurinolmetaboliten gewonnen werden, sondern auch durch die Untersuchung der zeitlichen Zusammenhänge bei der Ausscheidung dieser Metaboliten.

Tab. 13: Tagesprofil der Orotsäure (OS)- und Orotidin (OT)- Ausscheidung am 16. Versuchstag von Versuch I in $\mu\text{mol/h}$. Stundenmittel der 2. Versuchsperiode berechnet aus dem Durchschnitt der Tage 10 - 13.

Ver- suchs- Pers.	Purin	Orotsäure und Orotidinausscheidung stündliche Ausscheidung in Fraktion				Stundenmittel der Orotsäure- und Orotidinausscheidung	
		I (0-5)	II (5-9)	III (9-13)	IV (13-24)	am 16. Ver- suchstag	i.d. 2.Ver- suchsperiode
1	Guanosin	8,0 10,7	10,2 7,3	16,1 17,3	7,1 14,5	9,3 13	14,5 OS 11,6 OT
2	AMP	4,9 5,3	4,9 5,4	16,1 8,0	8,4 8,3	8,4 7	7,5 OS 8,5 OT
3	Inosin	3,7 4,9	3,8 4,9	7,2 5,0	6,1 6,0	5,4 5,4	4,4 OS 5,4 OT
4	Adenin	12,9 5,2	9,9 5,0	5,1 3,5	5,0 6,0	7,5 5,3	10,25 OS 7,4 OT
5	IMP	5,9 5,6	9,4 4,7	15,0 6,6	8,5 6,9	9,2 6,2	9,3 OS 7,6 OT
6	Adenosin	6,7 10,6	8,4 9,8	12,9 10,9	8,9 11,6	9 11	12 OS 11,8 OT
7	GMP	4,3 10,3	5,3 10,4	5,1 11,7	7,2 15,1	5,9 12,8	14,3 OS 13,1 OT
8	Hypoxanthin	15,0 6,5	12,3 8,0	11,0 6,8	16,5 8,5	14,6 7,7	20,7 OS 9,7 OT
Ohne Purinzulage (Reiter et al., 1984), vgl. Abb.7		9,3 5,0	10,0 5,95	8,6 6,0	6,9 5,95		8,2 OS 5,8 OT

Abb. 7:

Tagesprofil der
Orotsäure- und
Orotidinausscheidung
am 4. Tag der morgend-
lichen Einnahme von 3,67
 μmol Allopurinol (nach
Reiter et al. 1984,
vgl. Tab. 13 unten)



----- Stundenmittel des Versuchstages

Hierzu wurden in Versuch I am 16. Versuchstag, dem ersten Tag der gleichzeitigen Einnahme von Allopurinol und Purinen, die 24-Stunden-Urine in 4 Fraktionen von 5,4,4 und 11 Stunden Dauer gesammelt; in diesen Fraktionen wurden sodann alle genannten Metaboliten bestimmt. In der Tabelle 13 ist die Orotsäure- und Orotidinausscheidung pro Stunde während der einzelnen Fraktionen aufgeführt. Um den Zeitpunkt der Purinwirkung festlegen zu können, findet sich in dieser Tabelle außerdem das Stundenmittel der Orotsäure- und Orotidinausscheidung in der 2. Versuchsperiode, das aus dem Durchschnitt der Versuchstage 10 -13 (s. Tab. 9) berechnet wurde. Die Tabelle enthält außerdem die Werte eines typischen Tagesprofils der Orotsäure- und Orotidinausscheidung, wie es etwa ab dem 4. Tag einer alleinigen Allopurinoleinnahme zu beobachten ist (nach Reiter et al., 1984). An der Darstellung dieser Werte (Abb. 7) läßt sich ersehen, daß die Orotsäureausscheidung/h in den ersten 3 Urinfraktionen (0 - 13 Stunden nach Allopurinoleinnahme) deutlich über dem Tagesdurchschnitt liegt mit dem Maximum in der 2. Fraktion (5 - 9 Stunden), während sie in der 4. Fraktion (13 - 24 Stunden) den Tagesdurchschnitt deutlich unterschreitet; die Orotidinausscheidung/h beträgt in der ersten Sammelperiode (0 -5 Stunden) etwas weniger, in den übrigen Fraktionen gleichmäßig etwas mehr als der Tagesdurchschnitt.

Die Zulage der Nahrungspurine führte zu ausgeprägten Änderungen dieser Tagesprofile, die sich nach Ausmaß, Dauer und Zeitpunkt der (maximalen) Hemmung der Orotacid- und Orotidinurie unterscheiden:

- Nach Einnahme von AMP, Adenosin, IMP, Inosin und Guanosin

war das Tagesprofil der Orotsäureausscheidung in charakteristischer Weise verändert: die stärkste Reduktion der Orotazidurie trat hier bereits in Fraktion I auf. In Fraktion II kam es bei IMP, Adenosin und Guanosin schon zu einem Wiederanstieg der Orotsäureausscheidung, die in Fraktion III bei allen Versuchspersonen ein ausgeprägtes Maximum erreicht. Dieses Maximum übertrifft nicht nur das Stundenmittel dieses Versuchtags,

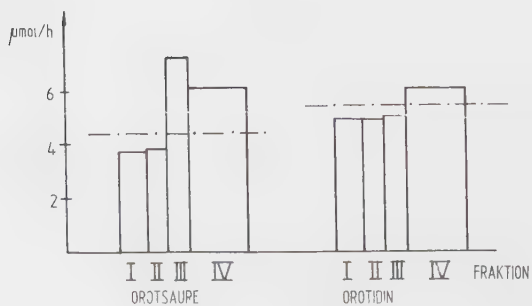
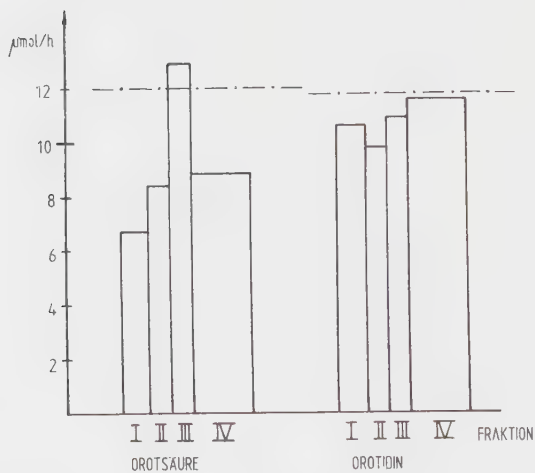
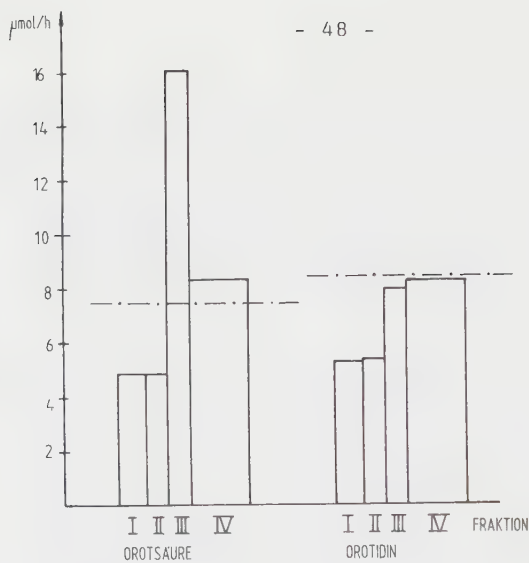


Abb. 8: Tagesprofile der Orotsäure- und Orotidinausscheidung (in $\mu\text{mol/h}$) am 16. Versuchstag nach Gabe von AMP (oben), Adenosin (Mitte) und Inosin (unten).

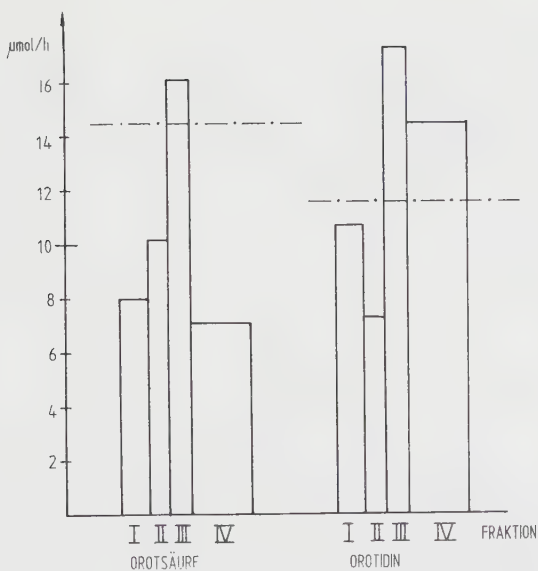
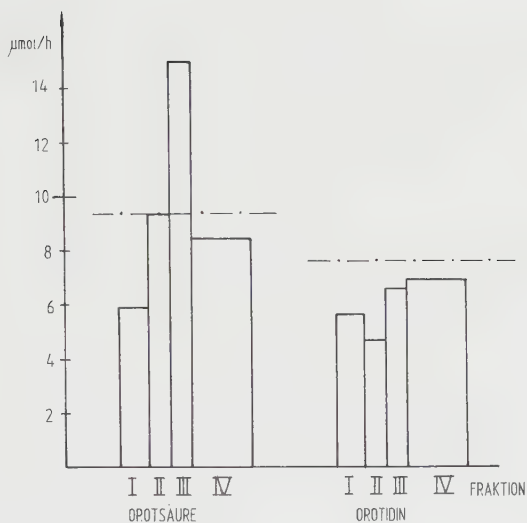


Abb. 8 (Fortsetzung): Tagesprofile der Orotsäure- und Orotidinausscheidung (in $\mu\text{mol/h}$) am 16. Versuchstag nach Gabe von IMP (oben) und Guanosin (unten).

--.-- durchschnittliche Ausscheidung/h in der 2. Versuchsperiode (Tag 10-13).

sondern auch die durchschnittliche stündliche Orotsäureausscheidung der vorausgehenden Versuchsperiode. In Fraktion IV fällt die Orotsäureausscheidung dann zumeist wieder massiv ab und liegt hier im Bereich des Tagesdurchschnittswerts (vgl. Abb. 8). Die Orotidinausscheidung ist ebenfalls in den Fraktionen I und II am stärksten reduziert, wobei das Minimum nach Adenosin, IMP und Guanosin erst in Fraktion II erreicht wird. In Fraktion III nähert sich die stündliche Orotidinausscheidung bereits wieder dem Maximalwert an, der mit Ausnahme von Guanosin in Fraktion IV erreicht wird. Nach Guanosin-Gabe weist die Orotidinausscheidung ebenso wie die Orotsäureausscheidung ein deutliches Maximum in Fraktion III auf und liegt ebenso wie in Fraktion IV über dem Stundenmittel dieses Versuchstags und der vorausgehenden Versuchsperiode; es kommt hierdurch zu einer Zunahme der Orotidinausscheidung während der Zulage von Guanosin.

- Nach Gabe von GMP

lag die Ausscheidung von Orotsäure und Orotidin in den Fraktionen I-III deutlich niedriger als in Fraktion IV und unter dem Stundenmittel des 16. Versuchstags und der 2. Versuchsperiode; das Minimum fand sich wiederum in Fraktion I (Abb. 9).

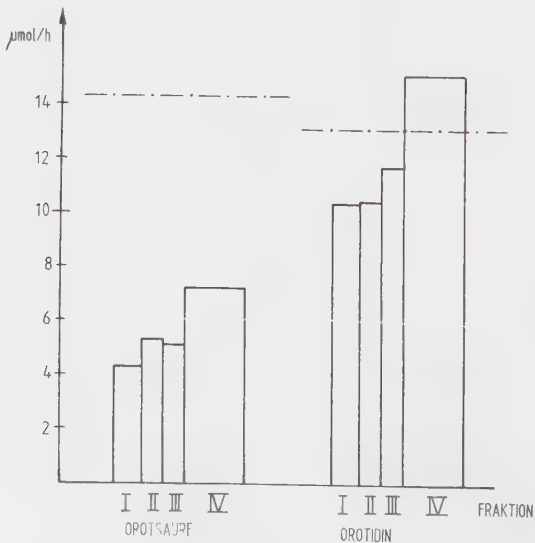


Abb. 9: Tagesprofil der Orotsäure- und Orotidinausscheidung
(in $\mu\text{mol/h}$) am 16. Versuchstag nach Gabe von GMP.

---.---. durchschnittliche Ausscheidung/h in der 2. Versuchs-
periode (Tag 10 - 13).

- Nach Einnahme von Hypoxanthin

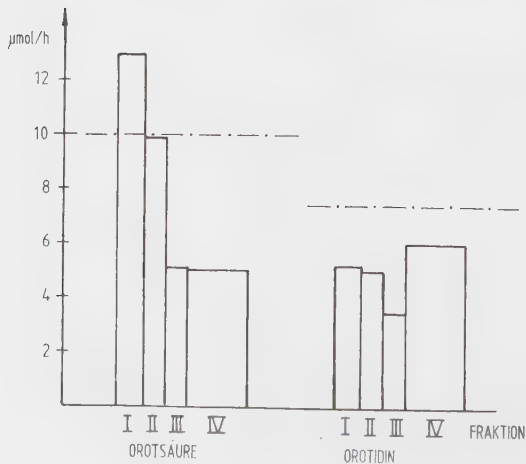
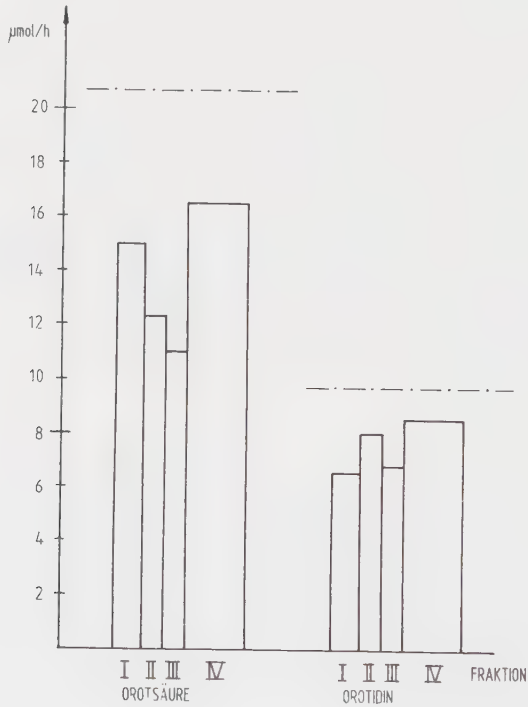
lag die Orotsäure- und Orotidinausscheidung/h in allen Fraktionen unter dem Stundenmittel der 2. Versuchsperiode und war ebenso wie nach Gabe von GMP in den Fraktionen I-III niedriger als in Fraktion IV. Die Orotsäureausscheidung nahm jedoch in den Fraktionen I-III kontinuierlich ab und erreichte so ihr Minimum erst in Fraktion III (Abb.10.)

- Nach Gabe von Adenin

nahmen sowohl die Orotsäure- als auch die Orotidinausscheidung in den Fraktionen I-III kontinuierlich ab. Berücksichtigt man jedoch das Stundenmittel der 2. Versuchsperiode, so ist die Orotsäureausscheidung nur in Fraktion III und IV reduziert; in Fraktion II ist die Orotsäureausscheidung ebenso groß wie im Stundenmittel der 2. Versuchsperiode, während sie in Fraktion I deutlich darüber liegt, so daß insgesamt nur eine geringe Abnahme der Orotazidurie nach einmaliger Gabe von Adenin resultiert (Abb. 10).

Abb. 10: Tagesprofil der Orotsäure- und Orotidinausscheidung (in $\mu\text{mol/h}$) am 16. Versuchstag nach Gabe von Hypoxanthin (oben) und Adenin (unten).

--- durchschnittliche Ausscheidung/h in der 2. Versuchsperiode (Tag 10 - 13).



IV. 2. ABSORPTION UND METABOLISIERUNG DER ORAL VERABREICHTEN PURINE SOWIE VON ALLOPURINOL

IV. 2. 1. TRENNLEISTUNG DES UMKEHRPHASENSYSTEMS

Das Ergebnis der photometrischen Konzentrationsbestimmung der Stammlösungen sowie das HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Umkehrphasen-System sind in Abb. 11 wiedergegeben:

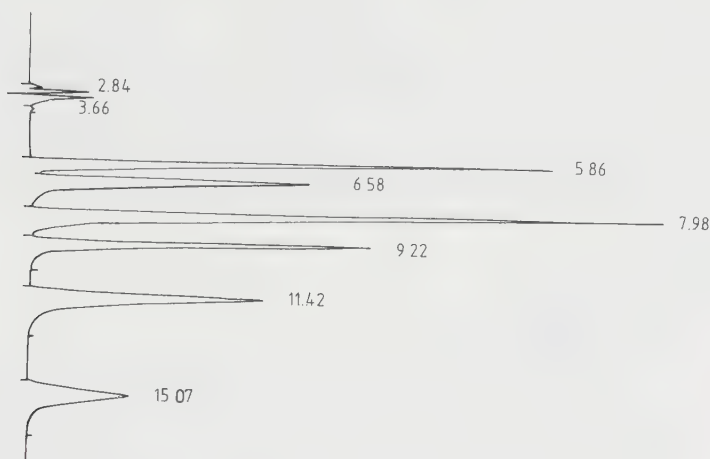


Abb. 11: HPLC-Chromatogramm der Standardmischung für das Umkehrphasen-System. Injektions-Volumen 0,05 ml. Flußrate 1 ml/Min. Wellenlänge 260 nm. Attenuation 2^6 . Slope Sensitivity 0,1. Papiervorschub 0,5 cm/Min.

Substanz	Konzentration (mM)		Retentionszeit (Min)
	Stammlösung	Standardmischung	
Harnsäure			5,86
Hypoxanthin	1,562	0,03	6,58
Xanthin	1,529	0,0588	7,98
Oxipurinol	1,345	0,0517	9,22
Allopurinol	1,542	0,0593	11,42
Allop-1-Rib.	1,04	0,02	15,07

Alle Standardsubstanzen sind ausreichend voneinander getrennt. Während die Purinausscheidung unter Normalkostbedingungen fast ausschließlich in Form von Harnsäure erfolgt, kommt es unter Allopurinolbehandlung durch die Hemmung der Xanthinoxidase zu einer deutlich vermehrten Ausscheidung der Harnsäurevorstufen Xanthin und Hypoxanthin, während die Harnsäureausscheidung zurückgeht. Daneben findet sich Allopurinol, Oxipurinol und Allopurinol-1-Ribosid im Urin. Abb. 12 zeigt das HPLC-Chromatogramm eines Urins vom Ende der 2. Versuchsperiode von Versuch I: Unter purinfreier Diät und Allopurinoleinnahme besteht nur noch eine geringe Harnsäureausscheidung, die in einer ähnlichen Größenordnung liegt wie die Ausscheidung der Harnsäurevorstufen Xanthin und Hypoxanthin. Allopurinol wird zum größeren Teil als Oxipurinol ausgeschieden, daneben zu etwa gleichen Anteilen in der unveränderten Form und als Allopurinol-1-Ribosid.

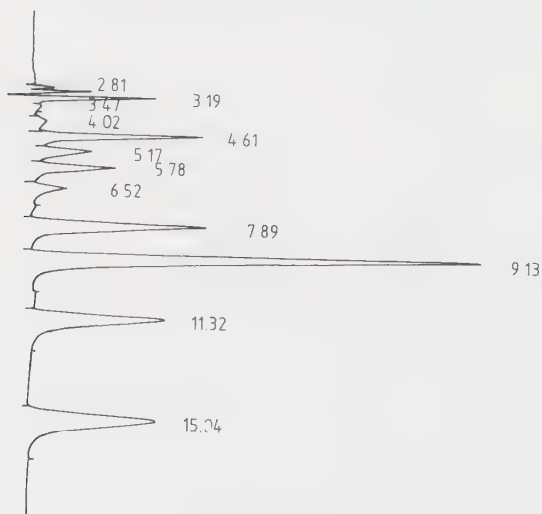


Abb. 12: HPLC-Chromatogramm des Urins (Verdünnung 1:15 durch Vortrennung) vom 13. Versuchstag (letzter Tag vor Beginn der Purinzulage) von Versuchsperson 3 (600 mg Allopurinol/die) im I. Versuch. Bedingungen wie in Abb. 11. Identifizierbare Peaks: Pseudouridin (4,61), Harnsäure

(5,78), Hypoxanthin (6,52), Xanthin (7,89), Oxipurinol (9,13), Allopurinol (11,32), Allopurinol-1-Ribosid (15,04).

Nach Zulage der Nahrungspurine zur purinfreien Diät unter Fortsetzung der Allopurinoleinnahme stieg insbesondere die renale Ausscheidung der Harnsäurevorstufen Xanthin und Hypoxanthin an, während die Harnsäureausscheidung selbst meist nur gering zunahm (vgl. Zöllner und Gröbner, 1970). Bei gleichzeitiger Einnahme von Purinen und Allopurinol kam es im Fall der Adenin- und Hypoxanthinderivate außerdem zu einer deutlichen Abnahme der Allopurinol-1-Ribosid-Ausscheidung. Zusätzliche Peaks, z.B. infolge renalер Ausscheidung von Purinnukleosiden, waren nicht zu beobachten. Als Beispiel ist in Abb. 13 das HPLC-Chromatogramm eines Urins von Versuchsperson 6 unter Einnahme von Adenosin wiedergegeben:

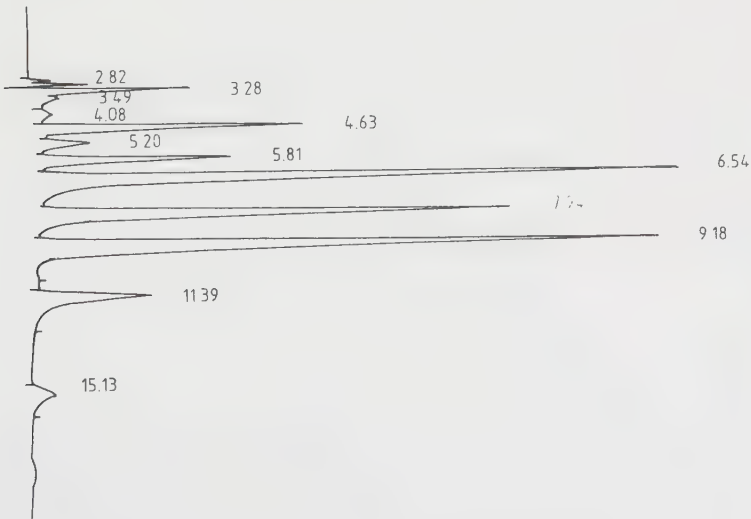


Abb. 13: HPLC-Chromatogramm des Urins (Verdünnung 1:15 durch Vortrennung) vom 15. Versuchstag (2. Tag der Purinzulage 5 Stunden nach Allopurinol) von Versuchsperson 6.

(825 mg Allopurinol und 2,4 g Adenosin/die) im I. Versuch. Bedingungen wie in Abb.8, Peakidentifizierung s. Abb. 9.

Lediglich bei der einmal täglich erfolgenden Gabe von Adenin (Versuchsperson 4 im I. Versuch) kam es zu einer Veränderung des HPLC-Chromatogramms, die auf das Vorhandensein eines zusätzlichen Metaboliten im Urin schließen ließ: In Abb. 14, die das Chromatogramm vom 15. Versuchstag, d.h. dem 2. Tag der Adenin-Einnahme 5 Stunden nach Allopurinol zeigt, erkennt man eine deutliche Deformierung des Oxipurinol-Peaks (Retentionszeit 9,23 Min.) durch ein lang auslaufendes Peak-Ende, auf dem der Allopurinol-Peak (Retentionszeit 11,43 Min.) aufsitzt.

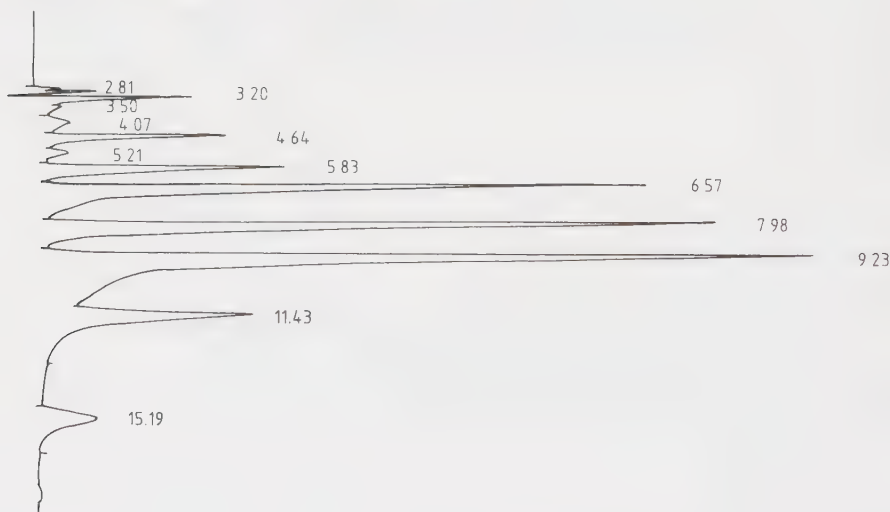


Abb. 14: HPLC-Chromatogramm des Urins (Verdünnung 1:15 durch Vortrennung) vom 15. Versuchstag (2. Tag der Purinzulage 5 Stunden nach Allopurinol) von Versuchsperson 4 (750 mg Allopurinol und 1,125 g Adenin/die) im I. Versuch. Bedingungen wie in Abb. 11, Peakidentifizierung s. Abb. 12. Deformierung des Oxipurinol-Peaks (9,23 Min.).

Durch Anheben des pH-Werts des Elutionspuffers auf pH 5,5 konnte gezeigt werden, daß die Deformierung des Oxipurinol-Peaks durch das Auftreten von unmetabolisiertem Adenin im Urin zustandekommt: In Abb. 15 hat der Oxipurinol-Peak (Retentionszeit 8,49 Min.) wieder seine übliche Form erhalten, der Allopurinol-Peak (Retentionszeit 10,59 Min.) sitzt wieder direkt der Grundlinie auf und am Ende des Chromatogramms erkennt man den sehr protrahiert eluierenden, flachen Adenin-Peak (Retentionszeit 27,6 Min). Während in diesem Chromatogramm Oxipurinol und Allopurinol nun gut quantifiziert werden können, ist der Adenin-Peak nicht zur Integration geeignet. Das Elutionsverhalten bzw. die Peakform von Adenin mußte daher verbessert werden, was durch Hinzufügen von 20 % Methanol zum Elutionspuffer gelang: Das Ergebnis ist in Abb. 16 dargestellt.

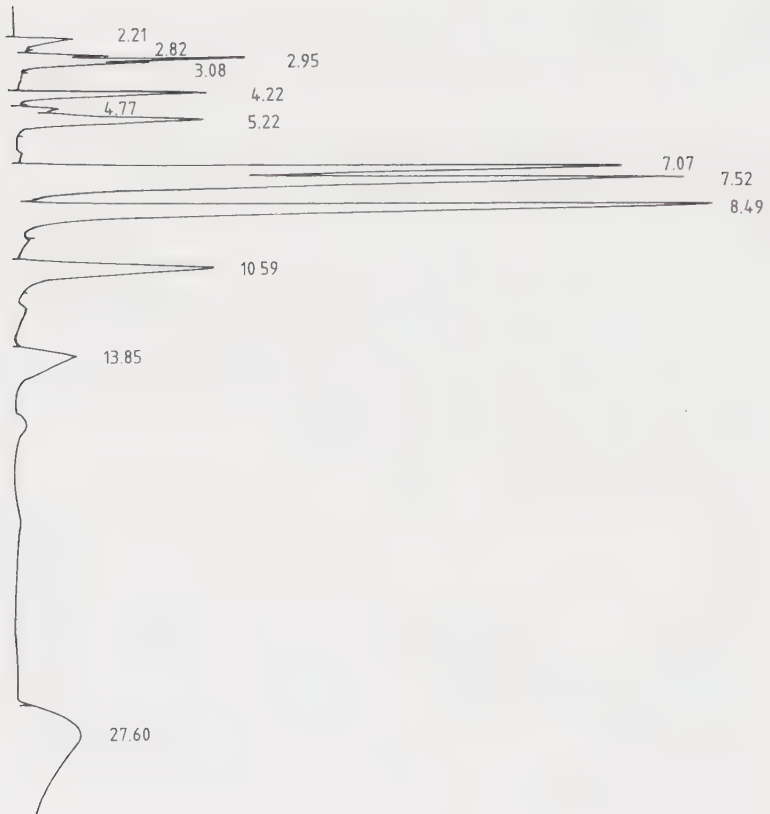


Abb. 15: HPLC-Chromatogramm des gleichen Urins wie in Abb. 14, Elutionspuffer-pH 5,5, sonst gleiche Bedingungen wie in Abb. 11. Peakidentifizierung: Oxipurinol (8,49 Min.), Allopurinol (10,59 Min.), Allopurinolribosid (13,85 Min.), Adenin (27,6 Min.).

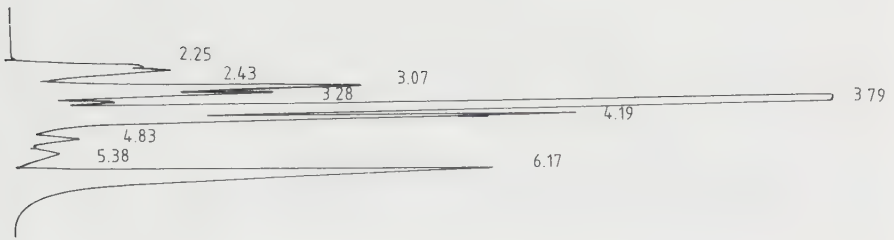


Abb. 16: Gleicher Urin wie Abb. 14 und 15, Elutionspuffer-pH 5,5 mit 20 % Methanol, sonst gleiche Bedingungen.
Peakidentifizierung: Allopurinol (4,19 Min.), Allop.-Rib. (4,83), Adenin (6,17).

IV. 2. 2. ABSORPTION UND METABOLISIERUNG DER ORAL VERABREICHTEN PURINE

Allopurinol hemmt den Endabbau der Purine zu Harnsäure am Enzym Xanthinoxidase. Absorbierte Nahrungspurine werden daher unter Allopurinolbehandlung hauptsächlich in Form der Harnsäurevorstufen Hypoxanthin und Xanthin ausgeschieden (Zöllner und Gröbner, 1970). Zur Ermittlung der intestinalen Mindestabsorptionsquote und der Art der Metabolisierung der einzelnen verabreichten Purine mußte infolgedessen die Zunahme der Hypoxanthin-, Xanthin- und Harnsäureausscheidung während der dritten Versuchsperiode (Gabe von Allopurinol und Purinen) gegenüber der zweiten Versuchsperiode (alleinige Gabe von Allopurinol) bestimmt werden.

Es war dabei zu berücksichtigen, daß Harnsäure und Oxipurinol, der Hauptmetabolit von Allopurinol (s.o. S. 16), aufgrund einer niedrigen renalen Clearance im Organismus akkumulieren. Die Hemmung der Xanthinoxidase nimmt daher in der zweiten Versuchsperiode während der ersten Tage der Allopurinoleinnahme zu, bis der Oxipurinolspiegel im Körper einen Gleichgewichtswert erreicht hat, bei dem sich Oxipurinolzufuhr und -ausscheidung entsprechen. Folglich nimmt während der ersten Tage der Allopurinoleinnahme die Harnsäurebildung kontinuierlich ab und die Ausscheidung der Harnsäurevorstufen Hypoxanthin und Xanthin steigt an. Aufgrund

der niedrigen renalen Harnsäureclearance dauert es dann nochmals einige Tage, bis sich der Harnsäurebestand des Körpers so weit verringert hat, daß die Harnsäureausscheidung der verminderten Harnsäurebildungsrate entspricht. Die in Tabelle 14 angegebenen Durchschnittswerte der Harnsäureausscheidung an den einzelnen Tagen der zweiten Versuchsperiode zeigen einen kontinuierlichen Rückgang der Harnsäureausscheidung während der gesamten zweiten Versuchsperiode (Tag 7 - 13):

Tab. 14: Durchschnittliche Harnsäureausscheidung an den einzelnen Tagen der zweiten Periode in Versuch I und II in $\mu\text{mol}/\text{die}$

Tag	7	8	9	10	11	12	13
Harnsäure- ausscheidung	2.601	1.663	1.588	1.283	1.283	1.179	1.139

Betrachtet man demgegenüber die Ausscheidungswerte der einzelnen Versuchspersonen (Tab. 15), so findet sich ein kontinuierlicher Abfall der Harnsäureausscheidung nur bei den Versuchspersonen 3, 6, 7, 8 im Versuch I und bei Versuchsperson 2 im Versuch II.

Bei diesen Versuchspersonen wurde die am letzten Tag der zweiten Versuchsperiode (Tag 13) gemessene Harnsäureausscheidung der Berechnung der Nahrungspurinabsorption zugrundegelegt.

Bei den übrigen Versuchspersonen fanden sich ca. ab dem 10. Versuchstag um einen Plateauwert schwankende Harnsäureausscheidungswerte. Hier wurde der Durchschnittswert der Tage 10 - 13 als basale Harnsäureausscheidung unter purinfreier Diät und Allopurinol angenommen (Tabelle 15, letzte Spalte).

Tab. 15: Harnsäure-, Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung ($\mu\text{mol}/\text{die}$) während der zweiten Versuchsperiode (purinfreie Diät + Allopurinol).

Versuchs- person	Allopuri- nol (mg/die)	Tag	7	8	9	10	11	12	13	Durchschnitt 10 - 13
Versuch I										
1	1 x 800	Hs	2.078	982	1.317	919	823	957	1.225	981
		X	479	355	369	n.b.	301	402	455	386
		Hx	260	112	108	134	76	186	163	140
2	1 x 750	Hs	2.275	1.825	1.674	1.217	1.592	1.344	(1.933)	1.384 (ohne 13)
		X	402	582	436	426	803	536	918	671
		Hx	116	225	147	124	516	165	391	299
3	1 x 600	Hs	1.554	1.065	1.126	746	1.154	541	402	448
		X	312	450	564	442	533	425	390	107
		Hx	75	114	126	77	190	91	70	
4	1 x 750	Hs	2.473	1.309	1.550	1.344	1.306	1.333	1.426	1.352
		X	391	611	878	436	667	932	387	606
		Hx	205	185	455	110	206	348	184	212
5	1 x 600	Hs	1.615	1.055	1.206	992	1.048	968	982	998
		X	226	687	426	500	249	567	406	431
		Hx	48	315	99	119	53	184	97	113
6	1 x 825	Hs	2.198	1.842	1.794	1.516	1.521	1.511	1.460	611
		X	310	516	422	733	593	508	609	363
		Hx	189	228	214	490	336	222	403	
7	1 x 725	Hs	2.002	1.717	1.780	1.478	1.404	1.169	1.072	760
		X	440	774	998	530	748	659	1.102	388
		Hx	277	345	509	143	410	351	646	

Versuchs- person	Allopuri- nol (mg/die)	Tag	7	8	9	10	11	12	13	Durchschnitt 10 - 13
Versuch I										
8	1 x 675	Hs	1.895	1.823	1.470	1.039	1.234	1.113	716	568 220
		X	417	563	609	531	500	596	645	
		Hx	196	154	258	100	158	229	394	
Versuch II										
2	3 x 250	Hs	4.181	2.583	2.015	1.844	1.611	1.333	1.317	1.397 196 19
		X	571	1.198	1.250	1.603	1.592	1.259	1.133	
		Hx	87	145	238	235	225	146	179	
		Adenin n.b.		n.b.	31	17	17	13	19	
8	3 x 225	Hs	3.881	1.957	1.695	1.540	1.104	1.177	1.409	1.308
		X	724	1.025	(1.965)	1.082	994	1.016	899	998
		Hx	125	156	(1.126)	93	193	196	164	162
9	3 x 260	Hs	4.461	2.133	1.845	1.474	1.312	1.527	1.377	1.423
		X	(2.327)	991	1.546	1.040	753	1.075	1.065	983
		Hx	(2.319)	203	577	311	(22)	317	208	279 (ohne 11)

Im Gegensatz zur Harnsäure haben Xanthin und Hypoxanthin eine hohe renale Clearance, die in der Nähe der glomerulären Filtrationsrate liegt (Goldfinger et al. 1965).

Ihre Ausscheidungsrate entspricht daher stets ihrer Bildungsrate. Wie die in Tabelle 16 angegebenen Durchschnittswerte der Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung an den einzelnen Versuchstagen der zweiten Versuchsperiode zeigen, steigt die Ausscheidung dieser Harnsäurevorstufen entsprechend der zunehmenden Hemmung der Xanthinoxidase während der ersten drei Tage der Allopurinoleinnahme an (Tag 7 - 9).

Die folgenden Tage 10 - 13 wurden der Berechnung der basalen Ausscheidung der Harnsäurevorstufen unter purinfreier Diät und Allopurinol zugrundegelegt.

Tab. 16: Durchschnittliche Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung an den einzelnen Tagen der zweiten Periode von Versuch I und II in $\mu\text{mol}/\text{die}$:

Tag	7	8	9	10	11	12	13
Xanthinausscheidung	427	696	750	732	703	725	675
Hypoxanthinausscheidung	158	198	273	176	236	221	264

Die entsprechenden Durchschnittswerte der einzelnen Versuchspersonen sind in der letzten Spalte von Tabelle 15 aufgeführt.

Aus der Harnsäure-, Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung am Ende der zweiten Versuchsperiode wurde die Gesamtpurinausscheidung berechnet und der prozentuale Anteil der Oxipurine bestimmt (Tabelle 17).

Die durchschnittliche Gesamtpurinausscheidung am Ende der zweiten Versuchsperiode beträgt $2.070 \mu\text{mol}/\text{die}$, die durchschnittlichen Anteile von Harnsäure, Xanthin und Hypoxanthin sind 54,5 % , 34,6 % und 11 %, sie verhalten sich wie 5:3:1.

Tab. 17: Basale Gesamtpurinausscheidung am Ende der zweiten Versuchsperiode (purinfreie Diät + Allopurinol) sowie prozentualer Anteil der Oxipurine an der Gesamtpurinausscheidung bei den einzelnen Versuchspersonen von Versuch I und II.

Versuchs- person	Gesamtpurin- ausscheidung in $\mu\text{mol}/\text{die}$	Anteil der Oxipurine an der Gesamtpurinausscheidung		
		% Harnsäure	% Xanthin	% Hypoxanthin

Versuch I

1	1.507	65,1	25,6	9,3
2	2.354	58,8	28,5	12,7
3	957	42,0	46,8	11,2
4	2.170	62,3	27,9	9,8
5	1.542	64,7	28,0	7,3
6	2.434	60,0	25,1	14,9
7	2.220	48,3	34,2	17,5
8	1.504	47,6	37,8	14,6

Versuch II

2	2.929	45,0	49,4	6,7
8	2.468	53,0	40,4	6,6
9	2.685	53,0	36,6	10,4

Durch- schnitt	2.070	54,5	34,6	11,0
-------------------	-------	------	------	------

Nach Purinzulage fand sich in der dritten Versuchsperiode (Tag 14 - 20) nur ein geringer Anstieg der durchschnittlichen Harnsäureausscheidung, während die durchschnittliche Xanthin- und Hypoxanthinausscheidung um das drei- bzw. sechsfache anstieg (vgl. Tab. 14, 16 und 17).

Die erhöhten Ausscheidungswerte der Oxipurine blieben dabei vom ersten bis zum letzten Tag dieser dritten Versuchsperiode relativ konstant, was sich im Fall der Harnsäure mit der nur gering vermehrten Bildungsrate, im Fall von Xanthin und Hypoxanthin mit der hohen renalen Clearance erklärt (s.o.).

Tab. 18: Durchschnittliche Harnsäure-, Xanthin- und Hypoxanthin-

ausscheidung an den einzelnen Tagen der dritten Periode
(purinfreie Diät + Allopurinol + Purinzulage) von Ver-
such I und II in $\mu\text{mol}/\text{die}$:

Tag	14	15	16	17	18	19	20
HS	1.247	1.409	1.293	1.699	1.235	1.252	1.271
X	2.007	2.146	2.095	2.239	2.077	2.190	2.197
HX	1.307	1.311	1.391	1.576	1.510	1.456	1.309

Tab. 19: Harnsäure-, Xanthin- und Hypoxanthin-Ausscheidung ($\mu\text{mol}/\text{die}$) während der 3. Versuchsperiode (purinfreie Diät + Allopurinol (wie in Tab. 15) + Purinzulage (mmol/die)).

Versuchs- person	Versuchs- lage	Tag	14	15	16	17	18	19	20	Durchschnitt Tage 14 - 20
Versuch I										
1	Guanosin	Hs	1.151	1.399	1.634	2.542	1.670	2.070	1.732	1.901 (19-20)
Tag 14-18	= 1 x 8, 8	x	3.007	1.796	2.392	3.182	1.126	2.592	2.659	2.626 (19-20)
Tag 19/20	= 1 x 5, 9	Hx	283	175	192	216	124	181	314	248 (19-20)
2	AMP	Hs	1.007	1.272	1.119	1.584	1.505	1.307	1.320	1.302
	1 x 8, 3	x	1.135	1.468	1.461	1.410	1.310	1.401	1.421	1.372
		Hx	823	1.464	1.187	1.047	891	1.805	1.012	1.176
3	Inosin	Hs	1.083	983	905	1.071	611	856	902	916
	1 x 6, 5	x	868	1.126	1.046	999	574	1.073	1.221	987
		Hx	788	1.082	1.100	735	475	913	1.211	901
4	Adenin	Hs	1.918	1.775	1.678	2.313	876		1.118	1.613
	1 x 8, 3	x	1.757	1.935	2.171	2.722	1.563		1.820	1.995
		Hx	1.613	2.011	3.775	3.884	2.766		2.670	2.787
	Adenin		3.101	1.333	1.511	2.859	996		n.b.	1.960
5	IMP	Hs	1.514	899	1.276	(2.967)	1.387	883	874	1.139 (ohne 17)
	1 x 6, 7	x	1.327	512	1.010	1.830	1.048	1.294	1.436	1.208
		Hx	1.338	576	1.078	1.424	670	1.290	1.738	1.159
6	Adenosin	Hs	1.544	1.493	1.264	2.152	1.030	1.807	1.725	1.574
	1 x 9, 0	x	1.588	1.451	813	1.047	699	1.357	433	1.055
		Hx	1.732	2.135	578	1.073	1.004	1.412	517	1.207

Versuchs- person	Purin- zulage	Tag	14	15	16	17	18	19	20	Durchschnitt Tage 14 - 20
7	GMP Tag 14 - 18 = 1 x 8,0 Tag 19 / 20 = 1 x 5,3	Hs x Hx	733 3.252 437	2.162 4.010 222	1.307 2.831 339	2.291 1.942 408	1.597 3.108 561	987 3.215 478	996 3.249 454	992 (19-20) 3.232 (19-20) 466 (19-20)
8	Hypoxanthin	Hs x Hx	1.182 1.593 2.638	1.658 1.874 2.535	1.215 1.431 1.834	1.710 1.851 2.485	(584) 1.448 2.747	1.251 1.514 2.782	1.204 1.952 (3.981)	1.370 (ohne 18) 1.666 2.504 (ohne 20)
Versuch II										
2	Adenin 3 x 2,8	Hs x Hx Adenin	1.316 3.556 2.128 74	1.311 3.783 1.738 168	1.112 3.903 2.106 211	1.089 3.943 2.600 260	1.247 4.231 2.358 162	1.082 3.171 1.876 n.b.	1.176 3.729 2.185 n.b.	1.190 3.759 2.142 175
8	AMP 3 x 2,5	Hs x Hx	1.275 1.818 877	1.462 2.306 996	1.617 3.176 1.656	1.361 2.071 1.050	1.143 2.999 2.043	1.489 3.229 1.902	1.739 2.874 1.368	1.441 2.639 1.413
9	Adenosin 3 x 2,9	Hs x Hx	989 2.179 1.721	1.090 3.349 1.489	1.097 2.815 1.451	876 3.631 2.415	1.288 4.745 2.976	785 3.049 1.925	1.194 3.368 1.626	1.046 3.305 1.943

Aufgrund dieser Beobachtung wurde die durchschnittliche Tagesausscheidung dieser Metaboliten in der dritten Versuchsperiode für die einzelnen Versuchspersonen aus den Werten der Tage 14 - 20 berechnet. Diese Durchschnittswerte sind in der letzten Spalte von Tabelle 19 aufgeführt.

Die Dosisreduktion von Guanosin und GMP an den Versuchstagen 19 und 20 führte im Falle von Guanosin zu keiner und im Falle von GMP nur zu einer geringen Abnahme der Oxipurinausscheidung, was auf Verluste durch Auskristallisieren von Xanthin während der Tage 14 - 18 zurückzuführen sein dürfte; aus diesem Grunde wurden bei den Versuchspersonen 1 und 7 nur die Versuchstage 19 und 20 zur Durchschnittsberechnung herangezogen.

Während die Verabreichung der übrigen Nahrungspurine lediglich zu einer erhöhten Ausscheidung von Harnsäure, Xanthin und Hypoxanthin führte, kam es nach Gabe von Adenin als Einzeldosis zusätzlich zu einem massiven Anstieg der Adeninausscheidung (Versuchsperson 4 in Versuch I). Bei Gabe von Adenin in drei verteilten Dosen war die Adeninausscheidung hingegen nur gering vermehrt.

Die Differenz der Gesamtpurinausscheidung zwischen der dritten und der zweiten Versuchsperiode ist für die einzelnen Versuchspersonen in Tabelle 20 angegeben. Aus der Zunahme der Purinausscheidung und der verabreichten Purinmenge läßt sich die Mindestabsorptionsquote für die einzelnen Purine berechnen. Die Mindestabsorptionsrate war für Adenin am höchsten, sie betrug bei Verabreichung als Einzeldosis 74,5 %, bei Gabe in drei verteilten Dosen 51,6 %.

Tab. 20: Zunahme der Purinausscheidung in der 3. gegenüber der 2. Versuchsperiode

Ver- suchs- pers.	Purinzu- lage μmol/die	Zunahme der Purinausscheidung einzelne Metaboliten μmol/die % der Mehraussch.			Gesamtpurine μmol/die	Mindest- absorptions- quote %
Versuch I						
1	Guanosin	Hs	920	28,2	3.268	55,4
		X	2.240	68,5		
	1 x 5.900	Hx	108	3,3		
2	AMP	Hs	-82	-	1.496	18
		X	701	44,4		
	1 x 8.300	Hx	877	55,6		
3	Inosin	Hs	514	27,8	1.847	28,4
		X	539	29,2		
	1 x 6.500	Hx	794	43		
4	Adenin	Hs	261	4,2	6.185	74,5
		X	1.389	22,5		
	1 x 8.300	Hx	2.575	41,6		
		A	1.960	31,7		
5	IMP	Hs	141	7,2	1.964	29,3
		X	777	39,6		
	1 x 6.700	Hx	1.046	53,2		
6	Adenosin	Hs	114	8,1	1.402	15,6
		X	444	31,7		
	1 x 9.000	Hx	844	60,2		
7	GMP	Hs	80	-	2.470	46,6
		X	2.472	96,9		
	1 x 5.300	Hx	78	3,1		
8	Hypoxanthin	Hs	654	16,2	4.036	53,8
		X	1.098	27,2		
	1 x 7.500	Hx	2.284	56,6		
Versuch II						
2	Adenin	Hs	-127	-	4.337	51,6
		X	2.362	52,9		
	3 x 2.800	Hx	1.946	43,6		
		Ad	156	3,5		
8	AMP	Hs	133	4,4	3.025	40,3
		X	1.641	54,2		
	3 x 2.500	Hx	1.251	41,4		
9	Adenosin	Hs	-377	-	3.609	41,5
		X	2.322	58,3		
	3 x 2.900	Hx	1.664	41,7		

Hohe Absorptionsquoten hatten auch Hypoxanthin (55,8 %), GMP (46,6 %) und Guanosin (55,4 %).

Deutlich schlechter wurden IMP (29,3 %) und Inosin (28,4 %) absorbiert. Die geringsten Absorptionsquoten wiesen bei Gabe als Einzeldosis AMP (18 %) und Adenosin (15,6 %) auf, bei Verabreichung in drei verteilten Dosen erhielt man dagegen Absorptionsquoten von 40,3 % bzw. 41,5 %.

Betrachtet man den in Tabelle 20 angegebenen Anteil der einzelnen Oxipurine an der Purinmehrausscheidung, so erkennt man, daß nur ein kleiner Teil der absorbierten Nahrungspurine als Harnsäure ausgeschieden wird:

Nach Verabreichung von Guanosin sind es 28,2 % der Mehrausscheidung bzw. 15,6 % der verabreichten Dosis, nach Gabe von Inosin 27,8 % der Mehrausscheidung bzw. 7,9 % der Dosis, nach Gabe von GMP 13,5 % der Mehrausscheidung bzw. 6,9 % der Dosis und nach Gabe von Hypoxanthin 16,2 % der Mehrausscheidung bzw. 8,7 % der Dosis.

Bei den übrigen Purinen liegt der Anteil der Harnsäure an der Zunahme der Purinausscheidung deutlich unter 10 %.

Nach Verabreichung von AMP und GMP in Versuch I sowie von Adenin und Adenosin in Versuch II ging die Harnsäureausscheidung in der dritten Versuchsperiode sogar unter die Ausscheidung der zweiten Versuchsperiode zurück.

Nach Gabe von Guanosin und GMP erfolgte die Purin-Mehrausscheidung zum allergrößten Teil (68,5 bzw. 96,9 %) in Form von Xanthin, zu einer Mehrausscheidung von Hypoxanthin kam es hier praktisch nicht (+ 3,3 bzw. 3,1 %).

Die Gabe von Hypoxanthin und Adenin bzw. deren Derivaten Inosin, IMP, Adenosin und AMP bewirkte im Versuch I eine Purin-Mehrausscheidung in erster Linie in Form von Hypoxanthin (41,6 - 60,2 % der Mehrausscheidung, durchschnittlich 51,7 %), welche die Mehrausscheidung in Form von Xanthin (22,5 - 44,4 %, durchschnittlich 32,4 %) um das 1,25 fache bis 2,08fache, durchschnittlich 1,65fache überstieg.

Tab. 21: Tagesprofil der Harnsäure-, Xanthin- und Hypoxanthin-Ausscheidung am 16. Versuchstag im Versuch I (gleichzeitige Einnahme von Allopurinol und Nahrungspurinen am Beginn der 1. Sammelperiode) in $\mu\text{mol/h}$.

VP *	verab-reichtes Purin	Harnsäure-, Xanthin- und Hypoxanthin-Ausscheidung ($\mu\text{mol/h}$)					
		**F I 0-5 h	**F II 5-9 h	**F III 9-13 h	**F IV 13-24h	Tages-Ø Tag 16	Tages.Ø Ende 2. Periode
1	Guanosin	Hs 86	50	69	66	68	41
		X 262	124	78	25	100	16
		Hx 16	1	6	8	8	6
2	AMP	Hs 81	23	65	33	47	58
		X 86	81	67	40	61	28
		Hx 108	41	15	38	49	12
3	Inosin	Hs 41	48	16	40	38	17
		X 88	84	21	17	44	19
		Hx 165	50	1	6	46	4
4	Adenin	Hs 113	82	32	60	70	56
		X 125	169	71	53	90	25
		Hx 377	311	69	34	157	9
		Ad 297	7	0	0	-	-
5	IMP	Hs 72	79	46	38	53	42
		X 91	95	26	6	42	18
		Hx 172	35	7	4	45	5
6	Adenosin	Hs 38	44	50	64	53	61
		X 46	87	30	11	34	25
		Hx 74	22	6	8	24	15
7	GMP	Hs 45	0(?)	82	68	54	45
		X 224	205	87	49	118	32
		Hx 22	9	11	14	14	16
8	Hypoxan- thin	Hs 24	60	59	56	51	30
		X 104	138	70	8	60	24
		Hx 244	126	25	1	76	9

* VP = Versuchsperson

** F = Fraktion

Die Verabreichung von Adenin, Adenosin und AMP in Versuch II in drei geteilten Dosen führte dagegen zu einem Überwiegen der Mehrausscheidung in Form von Xanthin (52,9 - 58,3 %, durchschnittlich 55,1 %) gegenüber der in Form von Hypoxanthin (41,4 - 43,6 %, durchschnittlich 42,2 %) entsprechend einer Xanthin:Hypoxanthin-Relation von 1,21 - 1,4, durchschnittlich 1,31.

Zur Klärung der Frage, wie die Nahrungspurine bzw. ihre Metaboliten die Allopurinol-induzierte Orotazidurie und Orotidinurie reduzieren, wurden im Versuch I am 16. Versuchstag, d.h. am ersten Tag mit gleichzeitiger Einnahme von Allopurinol und Purinen, Tagesprofile der Orotsäure- und Orotidinausscheidung (Tab. 13) angefertigt. Die entsprechenden Ausscheidungsraten der Oxipurine pro Stunde sind für die 5, 4, 4 und 11 Stunden langen Sammelperioden in Tabelle 21 angegeben. Hypoxanthin hat bei allen Versuchspersonen das Maximum seiner Ausscheidung in Fraktion I (0 - 5 Stunden nach Purineinnahme). In Fraktion II (5 - 9 Stunden nach Purineinnahme) ist die Hypoxanthinausscheidung bei allen Versuchspersonen mit Ausnahme von Versuchsperson 4 um 50 % oder mehr zurückgegangen. In Fraktion III und IV liegt sie bei allen Versuchspersonen mit Ausnahme von Versuchsperson 4 wieder in der Größenordnung des Tagesdurchschnitts am Ende der zweiten Versuchsperiode.

Xanthin wird gegenüber Hypoxanthin deutlich verzögert ausgeschieden: Nach Gabe von Adenin, IMP, Adenosin und Hypoxanthin findet sich das Maximum der Xanthin-Ausscheidung in Fraktion II, nach Gabe von AMP und Inosin ist die Xanthin-Ausscheidung in Fraktion I und II annähernd gleich groß. Lediglich Guanosin und GMP, die nicht über Hypoxanthin, sondern direkt über Xanthin abgebaut werden, weisen das Maximum der Xanthin-Ausscheidung in Fraktion I und einen deutlichen Rückgang der Xanthin-Ausscheidung in Fraktion II auf.

In Fraktion III liegt die Ausscheidung von Xanthin nach Gabe von Guanosin, GMP, AMP, Adenin und Hypoxanthin noch deutlich über dem Tagesdurchschnitt am Ende der zweiten Versuchsperiode, nach Gabe von Adenin beträgt die Xanthinausscheidung in Fraktion IV noch mehr als das Doppelte des Tagesdurchschnitts am Ende der zweiten Periode.

Im Vergleich mit der Hypoxanthin- und Xanthinausscheidung weist die Ausscheidung von Harnsäure nur relativ geringe Schwankungen in den einzelnen Fraktionen auf.

Nach Gabe von Adenin findet sich eine größere Menge von unverstoffwechseltem Adenin nur in Fraktion I.

IV. 2.3. ABSORPTION UND METABOLISIERUNG VON ALLOPURINOL:

Zur Klärung der Frage, ob Nahrungspurine die Allopurinol-induzierte Orotazidurie über eine Hemmung der **Allopurinol-Absorption** oder eine Beeinflussung des **Allopurinol-Metabolismus** reduzieren, wurde die renale Ausscheidung von Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten Oxipurinol und Allopurinol-Ribosid in sämtlichen 24-Stunden-Urinen der zweiten und dritten Versuchsperiode bestimmt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 22 wiedergegeben.

Tab. 22: Ausscheidung von Allopurinol (A), Oxipurinol (O) und Allopurinol-Ribosid (AR) während der zweiten (purinfreie Diät + Allopurinol) und dritten (purinfreie Diät + Allopurinol + Purinzulage) Versuchsperiode in $\mu\text{mol}/\text{die}$.

Versuchs- person	Tag	7	8	9	10	11	12	13	$\bar{x}$ 10-13	% der Dosis
Versuch I										
1	A	470	540	604	612	542	660	810	656	11,2
	O	1.447	1.331	2.042	2.020	1.988	2.294	2.764	2.267	38,5
	AR	426	697	816	720	555	1.021	700	749	12,7
2	A	266	504	430	554	649	635	578	604	11
	O	1.093	2.175	2.247	2.181	2.541	2.076	2.775	2.393	43,4
	AR	518	235	412	520	318	854	827	630	11,4
3	A	221	479	622	605	842	463	561	618	14
	O	1.334	1.951	2.309	2.466	2.473	1.891	1.649	2.120	48
	AR	551	632	553	664	662	636	704	667	15,1
4	A	403	486	693	732	1.060	689	353	709	12,8
	O	1.724	2.539	2.892	3.090	2.796	2.539	2.501	2.732	49,5
	AR	296	270	80	709	621	305	350	496	9
5	A	415	675	683	684	643	781	708	704	16
	O	1.463	2.320	2.503	2.379	2.255	2.185	2.166	2.246	50,9
	AR	872	116	474	545	1.054	334	907	710	16,1
6	A	316	509	631	644	587	640	760	658	10,8
	O	1.372	2.543	2.976	3.266	2.974	3.129	3.394	3.191	52,6
	AR	437	304	645	689	358	542	503	523	8,6

Versuchs- person	Tag	7	8	9	10	11	12	13	Ø 10-13	% der Dosis
7	A	405	406	522	708	763	734	663	717	13,4
	0	1.243	1.957	2.790	3.479	3.118	2.929	2.418	2.986	56
	AR	169	222	181	589	329	482	255	414	7,8
8	A	479	464	390	554	789	776	655	694	14
	0	1.519	2.015	2.221	2.626	3.114	3.011	1.917	2.667	53,7
	AR	288	637	111	578	448	478	337	460	9,3
<u>Versuch II</u>										
2	A	568	638	490	590	774	665	619	662	12
	0	689	1.737	2.066	2.641	2.938	2.482	2.655	2.679	48,6
	AR	992	1.212	847	1.026	1.131	1.268	959	1.096	19,9
8	A	393	393	444	369	493	518	469	462	9,3
	0	899	1.693	2.354	2.274	2.473	2.490	2.710	2.487	50,1
	AR	915	1.070	968	1.086	1.052	653	781	893	18
9	A	703	202	705	239	277	261	406	296	5,2
	0	1.424	1.751	2.587	2.645	2.475	2.730	2.832	2.671	46,9
	AR	635	650	1.235	703	906	698	783	773	13,6

	Tag	14	15	16	17	18	19	20	Ø 16-20	% der Dosis
Versuch I										
VP 1 Guanosin	A	776	576	514	558	531	670	612	577	9,8
	0	1.868	2.172	1.913	2.886	2.341	3.561	3.333	2.807	47,7
	AR	469	407	615	540	226	587	426	479	8,1
2 AMP	A	434	626	746	1.478	1.289	1.369	999	1.176	21,3
	0	1.884	2.620	2.576	3.023	2.889	3.137	3.170	2.959	53,7
	AR	252	334	323	247	337	109	301	263	4,8
3 Inosin	A	588	590	988	1.299	937	965	831	1.004	22,8
	0	2.322	1.839	2.558	2.634	1.734	2.728	3.147	2.560	58
	AR	492	402	89	217	25	68	63	92	2,1
4 Adenin	A	1.658	914	972	888	676	Ø	962	875	15,9
	0	3.628	3.101	2.879	3.260	2.109	Ø	3.065	2.828	51,3
	AR	658	355	0	0	0	Ø	0	0	0
5 IMP	A	694	511	1.124	2.281	1.235	932	1.539	1.208 (ohne 17)	27,4
	0	2.155	1.372	2.202	5.701	2.617	2.450	2.322	2.398 (ohne 17)	54,4
	AR	524	456	114	133	253	169	190	182 (ohne 17)	4,1
6 Adenosin	A	795	646	691	1.227	760	1.635	195	902	14,9
	0	3.524	2.939	3.444	4.095	2.420	5.545	4.063	3.913	64,5
	AR	253	134	122	100	145	326	81	155	2,6

	Tag	14	15	16	17	18	19	20	Ø 16-20	% der Dosis
7 GMP	A	339	344	398	160	547	381	455	388	7,3
	0	1.623	2.909	3.059	3.280	3.118	2.433	2.998	2.978	55,9
	AR	239	382	292	148	111	195	270	203	3,8
8 Hypoxanthin	A	903	730	903	1.017	1.019	1.022	1.228	1.038	20,9
	0	2.446	2.780	2.679	2.753	2.053	3.867	3.209	2.912	58,7
	AR	650	288	7,1	53	49	145	79	67	1,3
Versuch II										
2 Adenin	A	1.639	1.390	1.515	1.251	1.242	1.011	1.296	1.335	24,2
	0	3.065	3.484	3.380	2.810	3.019	2.703	3.132	3.085	55,9
	AR	160	67	90	17	15	16	33	57	1,0
8 AMP	A	654	785	966	835	898	867	748	822	16,6
	0	2.989	3.238	3.513	3.517	3.127	2.781	3.202	3.195	64,4
	AR	218	195	137	247	75	79	167	160	3,2
9 Adenosin	A	536	788	785	952	1.180	829	1.071	877	15,4
	0	2.706	2.889	3.058	2.876	3.808	2.469	3.523	3.047	53,5
	AR	180	130	197	33	17	21	110	98	1,7

Die Ausscheidung der Oxipurinol-Riboside, die ca. 1 % der verabreichten Allopurinoldosis beträgt (Elion 1978), konnte mit dem verwendeten HPLC-System nicht gemessen werden.

Bei der Bestimmung der Allopurinol-Absorption an Hand der im Urin ausgeschiedenen Metaboliten ist zu berücksichtigen, daß der Hauptmetabolit Oxipurinol im Organismus akkumuliert. Die Ausscheidung von Oxipurinol entspricht daher erst nach einigen Tagen seiner Bildung. Infolgedessen steigt auch die Gesamtausscheidung von Allopurinol und seinen Metaboliten während der ersten Tage der Allopurinoleinnahme an. Tabelle 23 zeigt die durchschnittliche Gesamtausscheidung von Allopurinol und seinen Metaboliten an den einzelnen Versuchstagen in Versuch I und II.

Tab. 23: Durchschnittliche Gesamtausscheidung von Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten Oxipurinol und Allopurinol-Ribosid an den einzelnen Tagen der zweiten Versuchsperiode von Versuch I und II in $\mu\text{mol}/\text{die}$.

Tag	7	8	9	10	11	12	13
Gesamtausscheidung	2.268	3.032	3.593	3.926	4.000	3.805	3.770

Es findet sich ein Anstieg der Gesamtausscheidung bis zum 5. Tag der Allopurinoleinnahme (Tag 11). Nachdem die durchschnittliche Gesamtausscheidung der Tage 12 und 13 unter den Wert von Tag 10 zurückgeht, wurde dieser in die Berechnung der durchschnittlichen Gesamtausscheidung während der zweiten Versuchsperiode für die einzelnen Versuchspersonen mit einbezogen. Diese Durchschnittswerte finden sich in Tabelle 24. Sie sind hier den entsprechenden Werten der dritten Versuchsperiode gegenübergestellt, die für Versuch I aus den Ergebnissen der Versuchstage 16 - 20, für Versuch II aus den Ergebnissen der Versuchstage 14 - 20 berechnet wurden.

An diesen Versuchstagen erfolgten Allopurinol- und Purineinnahme gleichzeitig.

Die Differenz der Werte von zweiter und dritter Versuchsperiode zeigt bei den meisten Versuchspersonen eine geringe Zunahme der Gesamtausscheidung von Allopurinol und seinen Metaboliten in der dritten Versuchsperiode (0,7 bis 21,3 %). Lediglich bei Versuchsperson 4 und 7 in Versuch I ging die Gesamtausscheidung um 5,8 bzw. 13,2 % zurück.

Die über alle Versuchspersonen gemittelte Absorptionsquote beträgt in der zweiten Versuchsperiode 73,6 % gegenüber 77 % in der dritten Versuchsperiode.

Tab. 24: Vergleich der Allopurinolabsorption während der zweiten (purinfreie Diät + Allopurinol) und der dritten Versuchsperiode (Diät + Allopurinol + Purinzulage). Gesamtausscheidung von Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten Oxipurinol und Allopurinol-Ribosid im 24 h-Urin in % der verabreichten Allopurinoldosis.

Versuchsperson	Allopurinol-Dosis		Gesamtausscheidung von Allopurinol (% der Dosis)		
	mg	μmol	2. Periode	3. Periode	Differenz (2. P = 100%)
Versuch I					
1 Guanosin	800	5.882	62,4	65,6	+ 5,1
2 AMP	750	5.515	65,8	79,8	+21,3
3 Inosin	600	4.412	77,1	82,9	+ 7,5
4 Adenin	750	5.515	71,3	67,2	- 5,8
5 IMP	600	4.412	83	85,9	+ 3,5
6 Adenosin	825	6.066	72	82	+13,9
7 GMP	725	5.331	77,2	67	-13,2
8 Hypoxanthin	675	4.963	77	80,9	+ 5,1
Versuch II					
2 Adenin	750	5.515	80,5	81,1	+ 0,7
8 AMP	675	4.963	77,4	84,2	+ 8,8
9 Adenosin	775	5.699	65,7	70,6	+ 7,5

Versuchsperson 2 und 8 nahmen an Versuch I und II teil und erhielten in beiden Versuchen die gleiche Allopurinoldosis. Bei Versuchsperson 2 lag die Absorptionsquote in Versuch I (Gabe von 1 x 750 mg/die) während der purinfreien 2. Versuchsperiode mit 65,8 % deutlich niedriger als in Versuch II (Gabe von 3 x 250 mg/die) mit 80,5 %.

Nach Purinzulage (dritte Versuchsperiode) waren die Absorptionsquoten in Versuch I und II mit 79,8 und 81,1 % jedoch praktisch gleich hoch.

Versuchsperson 8 wies in beiden Versuchen annähernd gleiche Absorptionsquoten auf (77,0 und 77,4 % in Versuch I, 80,9 und 84,2 % in Versuch II).

Während die Purinzulage in der dritten Versuchsperiode offensichtlich keine Hemmung der Allopurinol-Absorption bewirkte, hatte sie einen deutlichen Einfluß auf den Allopurinol-Metabolismus:

In der zweiten Versuchsperiode (purinfreie Diät + Allopurinol) betrug die Ausscheidung von Allopurinol-Ribosid 7,8 - 19,9 % (Durchschnitt 12,9 %) der verabreichten Dosis, wobei die Gabe in verteilten Dosen (Versuch II) mit einer höheren Ribosid-Bildung einherzugehen scheint:

Versuchsperson 2 schied in Versuch I 11,4 %, in Versuch II 19,9 % der Dosis als Allopurinol-Ribosid aus, Versuchsperson 8 verdoppelte die Ribosid-Bildung annähernd (von 9,3 auf 18 %).

Während der gleichzeitigen Einnahme von Allopurinol und Purinen (3. Versuchsperiode; Tag 16 - 20 von Versuch I, Tag 14 - 20 von Versuch II) kam es bei allen Versuchspersonen zu einem deutlichen Rückgang der Ausscheidung von Allopurinol-Ribosid.

Dieser Rückgang war am geringsten nach Guanosingabe (-36,2 %) und GMP-Gabe (-51,3 %); nach Gabe von Adenin und Hypoxanthin sowie ihrer Derivate erreichte er dagegen 57,9 - 100 % (Durchschnitt 82,1 %) (Tabelle 25).

Tab. 25: Ausscheidung von Allopurinol-Ribosid in % der verabreichten Allopurinoldosis während der zweiten Versuchsperiode (purinfreie Diät + Allopurinol) und der dritten Versuchsperiode (a: Purineinnahme 5 Stunden nach Allopurinoleinnahme: Tag 14/15 von Versuch I; b: Purineinnahme gleichzeitig mit Allopurinol: Tag 16 - 20 von Versuch I, Tag 14 - 20 von Versuch II).

Versuchsperson	verabreichtes Purin	Ausscheidung von Allopurinol-Ribosid in % der Dosis			Differenz i. % (2. P. = 100%)	
		2. Periode	3. Peri. a	3. Peri. b	2./3.a.	2./3.b.

Versuch I

1	Guanosin	12,7	7,4	8,1	-41,7	-36,2
2	AMP	11,4	5,3	4,8	-53,5	-57,9
3	Inosin	15,1	10,1	2,1	-33,1	-86,1
4	Adenin	9	9,2	0	+ 2,2	-100
5	IMP	16,1	11,1	4,1	-31,1	-74,5
6	Adenosin	8,6	3,2	2,6	-62,8	-69,8
7	GMP	7,8	5,8	3,8	-25,6	-51,3
8	Hypoxanthin	9,3	9,4	1,3	+ 1,1	-86

Versuch II

2	Adenin	19,9	-	1,0	-	-95
8	AMP	18	-	3,2	-	-82,2
9	Adenosin	13,6	-	1,7	-	-87,5

Im Versuch I erfolgte die Puringabe an den Tagen 14 und 15 fünf Stunden nach der Allopurinoleinnahme, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen der Purinwirkung auf den Allopurinolmetabolismus und dem Einfluß der Purine auf die Allopurinol-induzierte Orotacidurie zu überprüfen.

Wie aus Tabelle 25 hervorgeht, führt die verzögerte Purineinnahme bei Versuchsperson 4 und 8 zu keinerlei Abnahme der Allopurinol-

ribosidausscheidung, während die gleichzeitige Einnahme einen Rückgang um 100 % bzw. 86 % bewirkte.

Dies zeigt, daß keine Hemmung der Allopurinol-Ribosid-Ausscheidung durch die eingenommenen Purine bzw. deren Metaboliten vorliegt und daß bei diesen beiden Personen die Bildung von Allopurinol-Ribosid bis zur verzögerten Purineinnahme abgeschlossen war, so daß keine Hemmung der Allopurinol-Ribosid-Bildung wie bei gleichzeitiger Einnahme von Allopurinol und Purinen eintrat.

Bei den übrigen Versuchspersonen fand sich nach verzögerter Purineinnahme noch ein Rückgang der Allopurinol-Ribosid-Ausscheidung von durchschnittlich 41,3 % (25,6 - 62,8 %). Somit ist anzunehmen, daß bei diesen Versuchspersonen zum Zeitpunkt der verzögerten Purineinnahme die Allopurinol-Ribosid-Bildung noch nicht abgeschlossen war, d.h. noch nicht metabolisiertes bzw. noch nicht ausgeschiedenes Allopurinol in größerer Menge vorhanden war.

V. DISKUSSION

V. 1. VERSUCHSPLANUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, Anhaltspunkte über Mechanismen zu erhalten, durch die Nahrungspurine die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie reduzieren könnten (s.o. Einführung und Ziel der Arbeit). Zu diesem Zweck wurden in einem Ernährungsversuch 9 gesunde Probanden 3 Wochen lang mit einer purinfreien synthetischen Formeldiät ernährt; in der 2. und 3. Woche erhielten die Versuchspersonen Allopurinol, in der 3. Woche zusätzlich je eine Purinsubstanz (Adenin, Guanin, Hypoxanthin sowie deren Nucleoside und Nucleotide). Die große Zahl der Testsubstanzen erlaubte eine Prüfung der einzelnen Purine freilich nur in jeweils einer Dosis bei jeweils einer Versuchsperson, so daß nur individuelle Einzelergebnisse gewonnen werden konnten; allgemeingültige Angaben über z.B. Absorptionsquoten oder Metabolisierung der einzelnen Purine sind daher aus diesen Untersuchungen nicht abzuleiten. Dieser Nachteil wurde in Kauf genommen, da aus der Korrelation der Pyrimidin-, Purin- und Allopurinol-Metaboliten bei den einzelnen Versuchspersonen nach Gabe unterschiedlicher Purine differenziertere Auskünfte über Zusammenhänge zwischen Pyrimidin-, Purin- und Allopurinol-Stoffwechsel zu erwarten waren.

Die Dauer der einzelnen Versuchsperioden wurde mit Rücksicht auf die Probanden auf 7 Tage begrenzt. Längere Versuchsperioden wären insbesondere im Hinblick auf das Verhalten der Harnsäure-Ausscheidung wünschenswert gewesen: bei 5 von 9 Versuchspersonen nahm die Harnsäure-Ausscheidung über die gesamte Dauer der 2. Versuchsperiode (purinfreie Diät + Allopurinol) ab, so daß der Berechnung der exogenen Uratquote in der 3. Versuchsperiode kein Gleichgewichtswert der endogenen Uratquote zugrundegelegt werden konnte (vgl. Tab. 15). Bei längeren Versuchsperioden könnten u.U. auch aus den z.T. stark schwankenden Einzelmeßwerten der Pyrimidin-, Purin- und Allopurinolmetaboliten zuverlässigere Durchschnittswerte für die einzelnen Versuchsperioden gebildet werden. Eine zu lange Gesamtversuchsdauer gefährdet jedoch die Selbstdis-

ziplin der Probanden, die durch die wenig schmackhafte synthetische Diät und die kontinuierliche Urinsammlung stark beansprucht wird. Diät- und Urinsammelfehler dürften neben Einnahmefehlern der Testsubstanzen die Hauptursache für die große Streubreite der Meßwerte darstellen. Hinzu kommen bei ambulanten Ernährungsversuchen Unterschiede in der täglichen körperlichen Belastung; hierdurch werden unterschiedlich große Mengen von Purinen aus der Muskulatur freigesetzt, die größtenteils in Form von Hypoxanthin im Urin ausgeschieden werden (Harkness et al., 1983). Demgegenüber ist die Streuung durch die HPLC-Meßmethoden sehr gering, sie betrug z.B. für Orotsäure und Orotidin $\pm 1,8$ bzw. $\pm 1,4$ %. Bei der großen Zahl der Urinproben wurden die HPLC-Messungen nur anfangs als Doppelbestimmungen durchgeführt; nachdem sich hierbei stets eine sehr gute Übereinstimmung der Doppelwerte gezeigt hatte, wurden die weiteren Messungen als Einzelbestimmungen vorgenommen.

Allopurinol und Purine wurden in hohen Dosen verabreicht, um möglichst deutliche Effekte zu erzielen. Die gegenüber der Standarddosis von 300 mg/die auf das 2- bis 2,75-fache erhöhte Allopurinoldosis (600 - 825 mg/die) wurde von allen Versuchspersonen ohne Nebenwirkungen vertragen. Die Dosierung der Purine orientierte sich an den Versuchen von Gröbner und Zöllner (1983), die täglich 3×1 g der einzelnen Purine verabreicht hatten; im Fall der Purinbasen Adenin, Guanin und Hypoxanthin entspricht dies einer Dosis von $3 \times 7,4$ mmol (s. Tab. 1). Da in Versuch I die Puringabe als tägliche Einzeldosis erfolgen sollte, wurde die Dosis für alle Purine auf $1 \times 7,5$ mmol/1,73 m² Körperoberfläche festgesetzt. Leider erwies sich diese Dosis im Fall von Guanosin und GMP als noch zu hoch (die zur Guanin-Einnahme vorgesehene Versuchsperson mußte den Ernährungsversuch infolge eines Unfalls vorzeitig abbrechen): beide Versuchspersonen klagten über Schmerzen in der Nierengegend, die durch ein Auskristallisieren von Xanthin verursacht worden sein dürften. Die Purindosis wurde daraufhin sofort auf 5,9 bzw. 5,3 mmol/die reduziert und die Trinkmenge auf 2 - 3 l pro die gesteigert, was rasch zu Beschwerdefreiheit führte. Aus Sicherheitsgründen sollte bei etwaigen zukünftigen Belastungsversuchen mit Purinen die Einzeldosis der Guaninderiva-

te noch weiter reduziert werden. Ähnliches gilt für die Verabreichung von Adenin wegen der Gefahr der durch Allopurinol zwar weitgehend, aber nicht vollständig hemmbaren Bildung des unlöslichen 2,8-Dihydroxy-Adenins (Schulman et al., 1971; Van Acker et al., 1977).

V. 2. ZUSAMMENHANG ZWISCHEN ABSORPTIONSQUOTEN UND METABOLISIERUNG DER VERABREICHTEN PURINE UND IHRER WIRKUNG AUF DIE ALLO- PURINOL-INDUZIERT E OROTACID- UND OROTIDINURIE

Bei ihren Untersuchungen über den Einfluß von Nahrungspurinen auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie stellten Gröbner und Zöllner (1983) bei Gabe grammäquivalenter Purindosen eine wesentlich stärkere Wirkung der Mononucleotide AMP und GMP als der Nucleoside Adenosin und Guanosin fest. Von den freien Basen hatte nur Hypoxanthin einen deutlichen Effekt, Adenin war wenig wirksam, während Guanin und Xanthin völlig unwirksam waren (s. Tab. 1). Als Ursache der fehlenden Wirkung von Guanin und Xanthin vermuteten Gröbner und Zöllner eine "mangelnde Resorption dieser Verbindungen aus dem Darmlumen"; diese Vermutung dürfte insbesondere für Guanin zutreffen, das in Form der wasserunlöslichen freien Base verabreicht worden war. Nachdem Guanin als Hydrochlorid oder Sulfat von Ratte und Schwein sehr gut absorbiert wird (Plentl und Schoenheimer, 1944; Brown et al., 1948; Simmonds et al., 1973 a), sollte in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von Guanin-HCl auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie beim Menschen untersucht werden. Leider verunglückte die hierzu vorgesehene Versuchsperson und mußte den Versuch abbrechen. Die sehr unterschiedliche Wirkung der übrigen Purine auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie wurde von Gröbner und Zöllner (1983) nicht weiter diskutiert; bezogen auf eine äquimolare Dosis verhielt sich z.B. die Wirkung von je 3 g Adenin:Adenosin:AMP wie 1:7,3:13,8 (vgl. Tab. 1). Nachdem das Dosis-Wirkungsverhältnis für die einzelnen Purine nicht untersucht war, ließ sich eine negative Korrelation von Dosis und Wirkung für die hohen Dosisbereiche, in denen die Pu-

rinbasen verabreicht worden waren, nicht ausschließen. In der vorliegenden Arbeit wurden die Purine daher äquimolar in einer Dosis von $7,5 \text{ mmol/l}$, $7,3 \text{ m}^2$ Körperoberfläche verabreicht. Durch Bestimmung ihrer Metaboliten im 24-Stunden-Urin wurden Anhaltspunkte für die Absorptionsquote und die Metabolisierung der einzelnen Purine gewonnen, die die Grundlage ihrer Wirkung auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie darstellen:

- Adenin:

In den Versuchen von Gröbner und Zöllner (1983) reduzierte Adenin in der hohen Dosis von $3 \times 7,4 \text{ mmol/die}$ die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie lediglich um 9 %; in der vorliegenden Arbeit bewirkte in Versuch I eine ähnliche Einzeldosis von $8,3 \text{ mmol/die}$ ebenfalls nur eine geringe Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie um 13 %. Diese schwache Wirkung von Adenin läßt sich nicht auf eine niedrige intestinale Absorptionsquote zurückführen: Nachdem exogenes Adenin in größerem Umfang reutilisiert und in die intrazellulären Nucleotid-Pools inkorporiert wird (s.o.S.11) und in der vorliegenden Arbeit 74,5 % der verabreichten Adenindosis im 24-Stunden-Urin wiedergefunden wurden, muß man offensichtlich selbst für hohe Einzeldosen eine weitgehend quantitative intestinale Absorption annehmen. Die Absorptionsrate kann dabei die Metabolisierungsrate übersteigen: die Mehrausscheidung an Purinen nach Zulage von Adenin bestand zu 31,7 % aus unverstoffwechseltem Adenin, zu 41,6 % aus Hypoxanthin, zu 22,4 % aus Xanthin und zu nur 4,2 % aus Harnsäure (vgl. Tab. 20). Die intestinale Adenin-Absorption ist offensichtlich ebenso wie die Adenin-Aufnahme in Kulturzellen in vitro von der anschließenden Adenin-Metabolisierung unabhängig (vgl. Zylka und Plagemann, 1975; Cartier, 1980). Entsprechend beobachteten Ericson et al. (1980) nach oraler Gabe von $2,52 \text{ mmol}$ Adenin in Abwesenheit von Allopurinol einen starken Anstieg der Konzentration von freiem Adenin im Plasma auf $7 \text{ } \mu\text{M}$ und der Urinausscheidung von freiem Adenin auf $75 \text{ } \mu\text{mol}$ innerhalb 2 Stunden, wobei das Maximum des Plasmaspiegels und der Urinausscheidung bereits während der ersten Stunde nach Adeningabe erreicht wurde. Adenin wird somit offensichtlich sehr

rasch intestinal absorbiert und renal eliminiert: In der vorliegenden Arbeit wurde unmetabolisiertes Adenin ebenfalls nur während der ersten Urinsammelperiode (0 - 5 Stunden nach Purineinnahme) ausgeschieden (vgl. Tab. 21). Während dieser Periode überstieg somit die absorbierte Adeninmenge die verfügbare APRT-Aktivität des Gesamtorganismus, so daß in ihr die maximal mögliche Bildungsrate von AMP und damit auch von ATP (vgl. Yushok, 1971; Snyder und Henderson, 1973; Snyder und Seegmiller, 1976) unter maximalem PRPP-Verbrauch erreicht wurde. Ein großer Teil des gebildeten AMP wurde jedoch offensichtlich sehr rasch abgebaut und als Hypoxanthin (0,368 mmol/Stunde), Xanthin (0,1 mmol/Stunde) und Harnsäure (0,057 mmol/Stunde) ausgeschieden (vgl. Tab. 21). Die große Menge an ausgeschiedenem Hypoxanthin und das Verhältnis der Hypoxanthin- zur Xanthinausscheidung von 3:1 in Fraktion I weisen darauf hin, daß der Abbau von AMP größtenteils über (IMP-)Inosin zu Hypoxanthin und nicht über IMP-XMP-Xanthosin zu Xanthin erfolgte (vgl. Lomax et al., 1975) und daß die Bildungsrate von Hypoxanthin hier die Aktivität der HGPRT und der Xanthinoxidase überstieg. In Urinfraktion II (5 - 9 Stunden nach Purineinnahme) kam es weiterhin zu einer massiv erhöhten Hypoxanthinausscheidung (0,311 mmol/Stunde). Der gleichzeitige Anstieg der Xanthinausscheidung auf 0,169 mmol/Stunde und die Abnahme des Verhältnisses der Hypoxanthin- zur Xanthinausscheidung auf 1,84:1 können durch eine verminderte Hemmung der Xanthinoxidase nach Eliminierung des kurzwirksamen Allopurinols (s.u.) und eine vermehrte Phosphoribosylierung von Hypoxanthin zu IMP nach Eliminierung von freiem Adenin (vgl. S. 11, Henderson und Khoo, 1965) mit einer Begünstigung des Abbauegates über XMP-Xanthosin zu Xanthin zustande gekommen sein. In Fraktion III und IV (9 - 13 bzw. 13 - 24 Stunden nach Purineinnahme) ging die Ausscheidung von Hypoxanthin (0,069 bzw. 0,034 mmol/Stunde) und Xanthin (0,071 bzw. 0,053 mmol/Stunde) deutlich unter die Werte der vorausgehenden Urinfraktionen zurück, sie lag jedoch bei Hypoxanthin noch um das 7,7- bzw. 3,8fache und bei Xanthin um das 2,8- bzw. 2,1fache über dem Stundenmittel am Ende der 2. Versuchsperiode (vgl. Tab. 21). Korreliert man diese Befunde der Absorption und Metabolisierung von Adenin mit dem Tagesprofil der Orotsäure- und Oroti-

dinausscheidung (Tab. 13 und Abb. 10), so findet man in Urinsammelfraktion I, der Periode des maximalen PRPP-Verbrauchs und der maximalen Hypoxanthin-Bildung, einen Anstieg der Orotsäureausscheidung über das Stundenmittel am Ende der 2. Versuchsperiode bei gleichzeitigem Rückgang der Orotidinausscheidung. Diese Befundkonstellation entspricht den eingangs (s.o.S.9) dargelegten Ergebnissen von Zellkulturversuchen (Ishii und Green, 1973; Snyder und Seegmiller, 1976): offensichtlich kann auch in vivo die Orotsäurebildung und -ausscheidung bei sehr großem PRPP-Verbrauch ansteigen, wenn die Carbamylphosphatsynthetase durch erhöhte ATP- und erniedrigte UTP-Spiegel aktiviert und die OPRT durch die erniedrigte PRPP-Konzentration gehemmt wird. Die gleichzeitige Abnahme der Orotidinausscheidung in Urinfraktion I läßt sich mit diesem Mechanismus ausreichend erklären. Für die Wirksamkeit weiterer denkbarer Mechanismen, insbesondere für eine verminderte ODC-Hemmung infolge reduzierter Synthese der Allopurinol- und Oxipurinol-Nucleotide bei PRPP-Mangel, oder für eine Hemmung der Orotsäureausscheidung durch Hypoxanthin, Xanthin, Harnsäure oder Adenin (s.o.S.6) ergibt die Befundkonstellation von Urinfraktion I keinen Anhalt, sie schließt sie jedoch nicht vollständig aus. Zu einer direkten Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase oder der Dihydroorotase (s.o.S.7) kommt es jedoch nach Adeningabe offensichtlich zunächst nicht. Der Rückgang der Orotsäure- und Orotidinausscheidung in Fraktion III und IV ist mit einer deutlichen Abnahme der Hypoxanthin- und Xanthin-Ausscheidung korreliert: offenbar sind die nach Adeningabe vermehrt gebildeten Adenin-Nucleotide (insbesondere ATP, s.o.) bereits in Fraktion III so weit abgebaut, daß sie die Carbamylphosphatsynthetase nicht mehr stimulieren können und daß die nur noch relativ gering vermehrte Bildung von Hypoxanthin und Xanthin in diesen Fraktionen eine starke Reduktion der Orotsäure- und Orotidinausscheidung bewirken kann. Mit dieser Interpretation lassen sich auch die in Versuch II bei Gabe von Adenin in 3 kleineren Teildosen (3 x 2,8 mmol/die) erhobenen Befunde gut vereinbaren: Die täglich dreimal wiederholte Gabe von Adenin in einer Dosis, die ca. einem Drittel (37,8 %) der von Gröbner und Zöllner (1983) verabreichten Dosis entsprach, reduzierte die Orotsäure- und Oro-

tidinausscheidung wesentlich stärker, und zwar um 47 %. Im Urin wurden hier nur 51,6 % der Adenindosis wiedergefunden; sie bestanden zu 52,9 % aus Xanthin, zu 43,6 % aus Hypoxanthin und nur zu 3,5 % aus unmetabolisiertem Adenin. Da nicht anzunehmen ist, daß kleine Teildosen zu einem geringeren Prozentsatz absorbiert werden als große Einzeldosen (s.o.), muß man die in Versuch II gegenüber Versuch I deutlich niedrigere Wiederfindungsquote von Adenin im Urin auf eine stärkere Utilisierung der kleineren Adenin-Einzeldosis mit entsprechender Abnahme der Purinsynthese *de novo* zurückführen (vgl. Seegmiller et al., 1968). Die gegenüber Versuch I sehr geringe Ausscheidung von unmetabolisiertem Adenin bedeutet eine annähernd vollständige Phosphoribosylierung des quantitativ absorbierten Adenins und damit einen höheren PRPP-Verbrauch pro die als in Versuch I. Eine weitere Steigerung des PRPP-Verbrauchs kann in Versuch II darüberhinaus durch eine vermehrte Reutilisierung des aus dem AMP-Abbau freigesetzten Hypoxanthins erfolgt sein: die Verschiebung des Verhältnisses der Hypoxanthin- zur Xanthinausscheidung von 1,85 in Versuch I auf 0,82 in Versuch II ist auf das bei verteilter Adeningabe über den Tag protrahierte Anfallen von Hypoxanthin zurückzuführen, das hierdurch zu einem größeren Prozentsatz von der HGPRT unter PRPP-Verbrauch zu IMP phosphoribosyliert und in den Abbauweg über XMP-Xanthosin-Xanthin (s.o.) eingeschleust werden kann. Das protrahierte Anfallen von Hypoxanthin ermöglicht freilich auch eine vermehrte direkte Oxidation zu Xanthin durch die Restaktivität der Xanthinoxidase. Der große PRPP-Verbrauch nach Gabe von Adenin äußert sich in beiden Versuchen in einem überwiegenden Rückgang der Orotidinausscheidung gegenüber der Orotsäureausscheidung (-25 % gegenüber -4 % in Versuch I, -52 % gegenüber -41 % in Versuch II) (s. Tab. 12), der auf die Hemmung der OPRT bei PRPP-Mangel zurückzuführen ist (s.o.). Die in Versuch II gegenüber Versuch I wesentlich stärkere Abnahme der Orotazidurie (-41 % gegenüber -4 %) dürfte z.T. damit zu erklären sein, daß es nach Gabe der kleineren Teildosen von Adenin wohl nur zu einem geringeren Anstieg der ATP-Spiegel und damit zu einer schwächeren Aktivierung der Carbamylphosphatsynthetase kommt. Bei gleichzeitigem PRPP-Mangel dürfte daher in Versuch II der in Versuch I be-

obachtete Anstieg der Orotsäurebildung in den ersten Stunden nach Adenineinnahme unterbleiben. Die in Versuch I erst 9 - 24 Stunden nach Adenineinnahme auftretende Reduktion der Orotsäureausscheidung, die zu diesem Zeitpunkt nur noch der relativ gering vermehrten Bildung von Hypoxanthin und Xanthin zugeschrieben werden kann, dürfte daher in Versuch II über die gesamte Dauer des Versuchstages erfolgen. An der insgesamt stärkeren Wirkung der verteilten Adeningabe in Versuch II dürfte außerdem die kontinuierlich hohe Hypoxanthin- und Xanthinbildung beteiligt sein: Während in Fraktion III und IV von Versuch I die Hypoxanthinbildung nur noch 69 bzw. 34 $\mu\text{mol/Stunde}$ und die Xanthinbildung 71 bzw. 53 $\mu\text{mol/Stunde}$ betrug, belief sich die über den Tag gemittelte Ausscheidung von Hypoxanthin in Versuch II auf 89 $\mu\text{mol/Stunde}$ und von Xanthin auf 157 $\mu\text{mol/Stunde}$ (s. Tab. 19). Möglicherweise kommt dabei der in Versuch II deutlich vermehrten Xanthinbildung besondere Bedeutung zu: in Versuch I wurden täglich 1,39 mmol, in Versuch II 2,36 mmol Xanthin aus Adenin gebildet, ebensoviel wie nach Gabe des ebenfalls sehr wirksamen GMP (vgl. Tab. 20, s.u.). Diese Beobachtung ist somit als erster Hinweis dafür zu bewerten, daß das Stoffwechselendprodukt Xanthin und nicht das stoffwechselaktive, PRPP-verbrauchende Hypoxanthin für die Reduktion der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie verantwortlich ist (s.u.). Dem zweiten und eigentlichen Endprodukt des Purinstoffwechsels, der Harnsäure, kommt demgegenüber keine Bedeutung zu: in Versuch II nahm die tägliche Harnsäureausscheidung in der 3. Versuchsperiode gegenüber der 2. Versuchsperiode ab (-0,127 mmol/die), während es in Versuch I nur zu einer geringen Zunahme der Harnsäureausscheidung kam (+0,261 mmol/die, s. Tab. 20). Dieses Phänomen läßt sich wohl am besten mit der Beobachtung von Jezewska (1973) erklären, wonach Hypoxanthin das gegenüber Xanthin bevorzugte Substrat der Xanthinoxidase darstellt: offensichtlich wird in Versuch II die Harnsäurebildung aus Xanthin durch das in einer durchschnittlichen Rate von 89 $\mu\text{mol/Stunde}$ gebildete Hypoxanthin (s. Tab. 19) kontinuierlich gehemmt, während in Versuch I die nur noch geringe Hypoxanthinbildung von 34 $\mu\text{mol/Stunde}$ 13 - 24 Stunden nach Adeningabe (s. Tab. 21) die Harnsäurebildung aus Xanthin nicht mehr hemmen kann.

- Hypoxanthin:

In den Versuchen von Gröbner und Zöllner (1983) bewirkte die Gabe von $3 \times 7,35$ mmol Hypoxanthin/die einen Rückgang der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie um 60 % und war damit mehr als sechsmal so wirksam wie die Gabe von Adenin (vgl. Tab.1). In der vorliegenden Arbeit reduzierte die Gabe einer täglichen Einzeldosis von 7,5 mmol Hypoxanthin die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie um 30 % (vgl. Tab. 12). 53,8 % der verabreichten Dosis wurden im Urin wiedergefunden und zwar zu 56,6 % in Form von Hypoxanthin, zu 27,2 % in Form von Xanthin und zu 16,2 % als Harnsäure (vgl. Tab. 20). Die Absolutwerte der Hypoxanthin- und Xanthin-Ausscheidung liegen dabei, auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Purindosis, noch gering unter den Werten nach Adeningabe. Während nach Adeningabe die Gesamtmenge an ausgeschiedenem Hypoxanthin und Xanthin unter entsprechendem PRPP-Verbrauch über AMP gebildet worden ist, läßt sich nach Hypoxanthingabe nicht feststellen, welcher Anteil des ausgeschiedenen Hypoxanthins und Xanthins eine Phosphoribosylierung durchlaufen hat: absorbiertes Hypoxanthin kann nach Phosphoribosylierung zu IMP entweder in Adenin-Nucleotide umgewandelt werden, die später wieder zu Hypoxanthin abgebaut werden können, oder über XMP in Guanin-Nucleotide umgewandelt werden. Sowohl XMP als auch die Guanin-Nucleotide werden schließlich zu Xanthin abgebaut, das jedoch auch durch die Restaktivität der Xanthinoxidase direkt aus Hypoxanthin gebildet werden kann. Bei vollständigem Fehlen der Xanthinoxidase (Xanthinurie) wird intravenös verabreichtes radioaktives Hypoxanthin ($0,64 \mu\text{mol}$) am ersten Tag zu 16 %, Adenin ($1,87 \mu\text{mol}$) dagegen nur zu 1 % ausgeschieden (Ayvazian und Skupp, 1965). Diese Beobachtung läßt sich nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse in vorliegender Arbeit übertragen, da hier die 4000- bis 11000fache Purindosis oral verabreicht wurde und trotz der hohen Allopurinoldosis eine Restaktivität der Xanthinoxidase vorhanden war, was sich durch die persistierende Harnsäurebildung belegen läßt. Die Ergebnisse von Ayvazian und Skupp legen jedoch die Vermutung nahe, daß unter den Bedingungen der vorliegenden Arbeit oral verabreichtes Hypoxan-

thin wesentlich weniger reutilisiert bzw. phosphoribosyliert wird als Adenin, daß somit auch die intestinale Absorption nicht quantitativ erfolgt und ein Teil des absorbierten Hypoxanthins unverändert ausgeschieden bzw. direkt zu Xanthin oxidiert wird. Der daher zu erwartende geringere PRPP-Verbrauch nach Gabe von Hypoxanthin dürfte auch dazu führen, daß hier die Orotsäureausscheidung (-37 %) stärker abnimmt als die Orotidinausscheidung (-17 %, vgl. Tab. 12). Vergleicht man die Tagesprofile der Orotsäureausscheidung nach Gabe von Hypoxanthin und Adenin (s. Abb. 10), so findet sich in beiden Fällen das Minimum der Orotsäureausscheidung erst in Fraktion III (9 - 13 Stunden nach Purineinnahme). In dieser Fraktion ist die Hypoxanthinausscheidung bereits auf ein Zehntel (25 $\mu\text{mol/Stunde}$) der Ausscheidung von Fraktion I (0 - 5 Stunden nach Puringabe, 244 $\mu\text{mol/Stunde}$) zurückgegangen, sie wird hier von einer noch deutlich erhöhten Xanthinausscheidung (70 $\mu\text{mol/Stunde}$) überwogen (vgl. Tab. 21). Offensichtlich liegen nach Gabe von Hypoxanthin ähnliche Verhältnisse vor wie nach Gabe von Adenin (s.o.): in den ersten Stunden nach Hypoxanthingabe (Fraktion I) dürften ebenso wie nach Adeningabe vermehrt Adeninnucleotide aus dem reichlich vorhandenen Hypoxanthin gebildet worden sein, die die hemmende Wirkung des hierbei entstandenen PRPP-Verbrauchs auf die Carbamylphosphatsynthetase aufheben können. Da die Bildung von Adeninnucleotiden und der PRPP-Verbrauch nach Hypoxanthingabe wesentlich geringer ist als nach Adeningabe, resultiert hier jedoch in Fraktion I kein Anstieg der Orotsäureausscheidung. Vielmehr kommt es zu einer relativ geringen Abnahme der Orotsäureausscheidung, die möglicherweise durch das vermehrt gebildete Xanthin (104 $\mu\text{mol/Stunde}$) bewirkt wird: die stärkere Abnahme der Orotsäureausscheidung in Fraktion II (5 - 9 Stunden nach Purineinnahme) geht mit einer noch weiter vermehrten Xanthinausscheidung (138 $\mu\text{mol/Stunde}$) und einer auf die Hälfte zurückgegangenen Hypoxanthinausscheidung (126 $\mu\text{mol/Stunde}$) einher. Offensichtlich entspricht dem Rückgang der Hypoxanthinausscheidung in Fraktion II und stärker noch in Fraktion III eine Abnahme der vermehrt gebildeten Adeninnucleotide, die der Reduktion der Orotacidurie durch Xanthin entgegenwirken. Die Orotacidurie scheint somit sowohl nach Adenin- als auch nach Hypoxanthingabe

nur dann zurückzugehen, wenn vermehrt gebildetes Xanthin den gegensätzlichen Effekt der aus Adenin oder Hypoxanthin gebildeten Adennucleotide überwiegen kann (vgl. o. S. 92). In Fraktion IV lagen nach Hypoxanthingabe sowohl die Hypoxanthin- als auch die Xanthinausscheidung unter dem Tagesdurchschnitt vom Ende der 2. Versuchsperiode, die Orotsäureausscheidung stieg hier wieder auf 80 % des Tagesdurchschnittes der 2. Versuchsperiode an und lag damit im Bereich von Versuchspersonen unter alleiniger Allopurinolgabe (vgl. Abb. 7, Tab. 13). Da die Wirkung von Hypoxanthin auf die Orotacidurie somit im Gegensatz zu Adenin nur 13 Stunden anhält, erklärt sich der von Gröbner und Zöllner (1983) beobachtete verstärkte Effekt der dreimaligen Gabe hoher Hypoxanthindosen. Eine hohe Einzeldosis von Adenin hatte demgegenüber zunächst eine steigernde, und erst nach 9 - 24 Stunden eine reduzierende Wirkung auf die Orotacidurie, weshalb die Verabreichung von täglich drei hohen Adendosen noch weniger wirksam war als nur eine Einzeldosis (s.o.).

- AMP, Adenosin, IMP, Inosin

Nach oraler Verabreichung werden IMP, AMP und Adenosin noch im Darmlumen zu Inosin abgebaut und als solches absorbiert (s.o. S. 10); wegen ihres gleichen Schicksals im Stoffwechsel sollen diese vier Purinverbindungen daher gemeinsam diskutiert werden.

Die Gabe einer täglichen Einzeldosis von AMP (8,3 mmol) oder IMP (6,7 mmol) hatte in Versuch I tatsächlich die gleiche Wirkung auf die Orotsäure- (-20 bzw. -23 %) und Orotidinausscheidung (-23 bzw. -25 %); nach Gabe von Adenosin (1 x 9 mmol) oder Inosin (1 x 6,5 mmol) kam es jedoch zu keiner (-1 %) bzw. nur einer minimalen (-7 %) Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie. Im Gegensatz zu dem nach Gabe einer hohen Einzeldosis ebenfalls wenig wirksamen Adenin (s.o.) ist der geringere Effekt von AMP, Adenosin, IMP und Inosin zumindest teilweise auf eine niedrige intestinale Absorptionsquote zurückzuführen: im Urin wurden nur 18; 15,6; 29,3 und 28,4 % der verabreichten Dosis wiedergefunden (vgl. Tab. 20). Nach Aufteilung der Purindosis in drei Einzeldosen in Versuch II stieg die Wiederfindungsquote von AMP von 18 auf 40,3 % und von

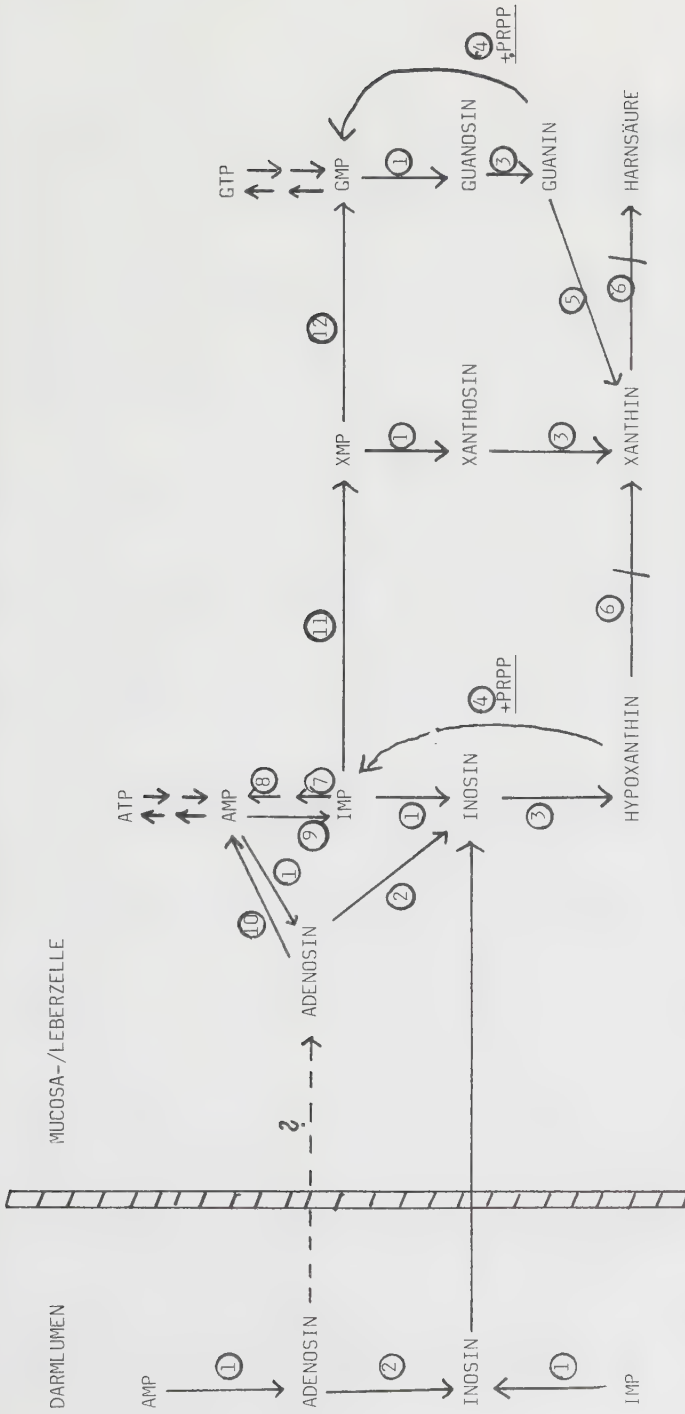


Abb. 18: Stoffwechselwege von oral verabreichtem AMP, Adenosin, IMP und Inosin. —/—: Hemmung durch Allopurinol. Beteiligte Enzyme: ① 5'-Nucleotidase (und andere Phosphatasen) ② Adenosindeaminase ③ Purinnucleosidphosphorylase ④ Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase ⑤ Guanase ⑥ Xanthinoxidase ⑦ Adenylosuccinat-synthetase ⑧ Adenylosuccinatlyase ⑨ AMP-Deaminase ⑩ Adenosinkinase ⑪ IMP-Dehydrogenase ⑫ GMP-Synthetase.

Adenosin von 15,6 auf 41,5 % an, was nur mit einer Verbesserung der intestinalen Absorption erklärt werden kann. Die im Vergleich mit Adenin oder Hypoxanthin niedrige Absorptionsquote von Inosin (sowie von IMP, AMP und Adenosin) könnte durch Allopurinol verursacht sein: Inosin wird zunächst unabhängig von seiner weiteren Verstoffwechselung über erleichterten Transport in die Zellen aufgenommen (Plagemann et al., 1981). Der Abbau von Inosin zu Hypoxanthin durch die Purinnucleosidphosphorylase in den Mucosazellen des Dünndarms ist jedoch in Gegenwart von Allopurinol gehemmt, da das entstehende Hypoxanthin infolge der Hemmung der Xanthinoxidase nicht aus dem Reaktionsgleichgewicht entfernt wird. Die Hemmung des Inosinabbaus in den Mucosazellen führt dann offensichtlich zu einer verminderten Absorptionsrate von Inosin, ähnlich wie bei Zellen mit Purinnucleosidphosphorylasemangel (Cohen und Martin, 1977). Durch Aufteilung der Purindosis in drei kleinere Teildosen kann bei vermindelter Absorptionsrate eine höhere Absorptionsquote erzielt werden. Erstaunlicherweise bewirkt jedoch im Falle von AMP die Aufteilung der Dosis ($3 \times 2,5$ mmol anstelle von $1 \times 8,3$ mmol) trotz der höheren Absorptionsquote (s.o.) keine stärkere Reduktion der Orotacid- und Orotidinurie (jeweils - 22 %); hier müssen wohl interindividuelle Unterschiede der einzelnen Versuchspersonen als Ursache angenommen werden; Gröbner und Zöllner (1983) hatten nach Gabe der annähernd gleichen Dosis von $3 \times 2,87$ mmol AMP/die einen Rückgang der Orotacid- und Orotidinurie um 48 % beobachtet (s. Tab. 1).

Die Wirkungslosigkeit von Adenosin in Versuch I (1×9 mmol/die) hat neben der niedrigen Absorptionsquote weitere Gründe: Bei Betrachtung der Ausscheidungswerte von Orotsäure und Orotidin an den einzelnen Tagen der 3. Versuchsperiode (Tab. 10) erkennt man eine starke Reduktion der Orotsäure (-66 %) und Orotidinausscheidung (-23,7 %) am ersten Tag der Purineinnahme (Tag 14); an den folgenden Tagen stieg die Orotsäure- und Orotidinausscheidung kontinuierlich an und übertraf ab dem fünften (Orotsäure) bzw. vierten (Orotidin) Tag der Adenosineinnahme den Durchschnittswert der Vorperiode (s. Tab. 9). Das Maximum der Orotsäureausscheidung lag am sechsten Tag der Adenosineinnahme um 44,9 %, das Maximum der Orotidinausscheidung am siebten Tag der Adenosineinnahme um 50,9 % über dem Durchschnittswert der Vorperiode. Aus der anfänglichen Reduktion und der anschließenden kontinuierlichen Steigerung der Orotsäure- und Orotidinausscheidung resultiert im Durchschnitt der 3. Versuchsperiode keine Änderung der Orotacid- und Orotidinurie. Dieses Phänomen läßt sich nur schwer erklären, um so mehr als die Oxipurinausscheidung bei dieser Versuchsperson sehr starken Schwankungen unterworfen ist und sich nicht mit dem kontinuierlichen Anstieg der Orotsäure- und Orotidinausscheidung korrelieren läßt (vgl. Tab. 19). Möglicherweise läßt sich aus den Tagesprofilen der Orotsäure- und Orotidinausscheidung nach Gabe von Adenosin, AMP, Inosin und IMP (s. Abb. 8) ein Hinweis auf das zugrundeliegende Geschehen ableiten: Im Gegensatz zu den Tagesprofilen nach Gabe von Adenin oder Hypoxanthin (s.o. und Abb. 10) findet sich hier die stärkste Reduktion der Orotsäureausscheidung nicht erst in Fraktion III, sondern bereits in Fraktion I (0 - 5 Stunden nach Purineinnahme). In Fraktion II kommt es nach Gabe von Adenosin, Inosin und IMP bereits zu einem Wiederanstieg der Orotsäureausscheidung, während die Orotidinausscheidung nach Adenosin und IMP weiter zurückgeht. In Fraktion III beobachtet man nach allen 4 Purinen einen sehr starken Anstieg der Orotsäureausscheidung über den Durchschnittswert der Vorperiode hinaus, im Falle von AMP sogar bis zum Doppelten dieses Durchschnittswertes. Die Orotidinausscheidung steigt in dieser Fraktion ebenfalls an, jedoch weniger ausgeprägt, und bleibt knapp unter dem Durchschnittswert der Vorperiode. In Fraktion IV geht die Orotsäure-

ausscheidung wieder deutlich zurück, während die Orotidinausscheidung weiter ansteigt. Diese 4 Purine bewirken somit zunächst (Fraktion I und II) eine Abnahme der Orotsäureausscheidung, die dann jedoch durch den starken Anstieg der Orotsäureausscheidung in Fraktion III und nach AMP und Inosin auch in Fraktion IV wieder mehr oder weniger ausgeglichen wird. Dieser Rebound-artige Anstieg der Orotsäureausscheidung läßt sich im Falle von Adenosin offensichtlich durch täglich dreimal wiederholte Gabe in Versuch II unterdrücken, was neben der verbesserten intestinalen Absorption die wesentlich stärkere Wirkung auf die Orotacid- und Orotidinurie erklären dürfte. Der kontinuierliche Anstieg der Orotsäure- und Orotidinausscheidung während der 3. Versuchsperiode von Versuch I unter Einnahme von Adenosin könnte auf einem täglich stärker werdenden "Rebound" in Fraktion III und IV beruhen; möglicherweise geht jedoch auch die reduzierende Wirkung in Fraktion I und II im weiteren Verlauf der 3. Versuchsperiode verloren.

Das späte Auftreten des Minimums der Orotsäureausscheidung in Fraktion III nach Gabe von Adenin oder Hypoxanthin wurde auf die vermehrte Bildung von Adennucleotiden bzw. ATP in Fraktion I und II zurückgeführt, die dem Effekt des PRPP-Verbrauchs auf die Carbamylphosphatsynthetase und dem noch nicht lokalisierbaren Effekt des vermehrt gebildeten Xanthins entgegenwirkt (s.o.). Das nach Gabe von AMP, Adenosin, IMP oder Inosin sofort in Fraktion I auftretende Minimum der Orotsäureausscheidung weist demnach darauf hin, daß es aufgrund der niedrigen Absorptionsrate dieser Purine zu keiner wesentlichen Mehrbildung von ATP kommt. Die Reduktion der Orotacidurie ist daher einem mäßigen PRPP-Verbrauch und der Bildung von Xanthin zuzuschreiben; letztere ist allerdings im Falle von Adenosin mit 46 $\mu\text{mol/Stunde}$ in Fraktion I recht gering, während sie bei den anderen Purinen 86 - 91 $\mu\text{mol/Stunde}$ beträgt (s. Tab. 21). Der nach Gabe von Adenosin und insbesondere von IMP ausgeprägte Wiederanstieg der Orotacidurie in Fraktion II ist nun aber nicht mit einem Rückgang der Xanthinbildung korreliert: vielmehr stieg die Xanthinausscheidung nach Adenosin hier auf 87 $\mu\text{mol/Stunde}$ und nach IMP auf 95 $\mu\text{mol/Stunde}$ an. Will man die Hypothese von der hemmenden Wirkung des Stoff-

wechselendprodukts Xanthin auf die Orotsäurebildung bzw. -ausscheidung aufrechterhalten (s.o. S.92 und 95/96), so muß man hier das Auftreten eines entgegengesetzten Mechanismus annehmen, der dann schließlich auch in Fraktion III den weiteren starken Anstieg der Orotacidurie bewirkt. Die starke Abnahme der Hypoxanthinausscheidung in Fraktion II dürfte demgegenüber für den Wiederanstieg der Orotsäureausscheidung ohne Bedeutung sein, da letzterer nur nach Adenosin und IMP zu beobachten ist, während die Hypoxanthinausscheidung nach allen vier Purinen stark zurückgeht (s. Tab. 21). Ebenfalls unwahrscheinlich ist die Annahme einer Hemmung der Orotsäureausscheidung durch Xanthin in Fraktion I und II mit verstärkter Ausscheidung der akkumulierten Orotsäure nach Rückgang der Xanthinausscheidung in Fraktion III: Nach Gabe von Adenosin steigen in Fraktion II sowohl die Orotsäure- als auch die Xanthinausscheidung an; nach Gabe von AMP steigt die Orotsäureausscheidung in Fraktion II um das 3,3fache an, während die Xanthinausscheidung nur geringfügig um 17 % zurückgeht. Eine kompensatorische Aktivitätssteigerung der Carbamylphosphatsynthetase in Fraktion III könnte durch einen erniedrigten UTP-Spiegel und einen Wiederanstieg der PRPP-Konzentration nach vollständiger Ausscheidung des vermehrt gebildeten Hypoxanthins verursacht werden und zum vorübergehenden starken Anstieg der Orotsäureausscheidung führen. Das Ausbleiben des starken kompensatorischen Anstiegs der Orotsäurebildung bzw. -ausscheidung in Fraktion IV nach Gabe von Hypoxanthin spricht trotz der in dieser Fraktion völlig normalisierten Hypoxanthin- und Xanthinausscheidung nicht unbedingt gegen diese Hypothese: Das in wesentlich größerem Umfang absorbierte Hypoxanthin bewirkt einen stärkeren PRPP-Verbrauch (vgl. o.S. 10) und wahrscheinlich auch eine länger anhaltende Senkung des PRPP-Spiegels als AMP, Adenosin, IMP und Inosin, die mit jedem absorbierten Molekül ein Molekül Ribose "mitbringen", das nach der phosphorolytischen Spaltung von Inosin in Hypoxanthin und Ribose-1-Phosphat über Ribose-5-Phosphat in PRPP umgewandelt werden kann. Die Annahme eines kompensatorischen Anstiegs der Orotsäureausscheidung in Fraktion III nach Gabe von AMP, Adenosin, IMP oder Inosin spricht auch dagegen, daß die Abnahme der Orotacidurie in Fraktion I und II auf einer Hemmung der

Pyrimidin-5'-Nucleotidase durch z.B. Xanthin oder Hypoxanthin mit daraus resultierender Feedback-Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase beruhen könnte.

- Guanosin und GMP:

GMP wird nach oraler Verabreichung im Darmlumen dephosphoryliert und in Form von Guanosin absorbiert; der Einfluß dieser beiden Purine auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie soll daher gemeinsam diskutiert werden. Absorbiertes Guanosin wird in den Mucosazellen des Dünndarms phosphorolytisch in Guanin und Ribose-1-Phosphat gespalten, das wiederum über Ribose-5-Phosphat in PRPP umgewandelt werden kann (s.o.). Guanin wird dann von der Guanase zu Xanthin deaminiert, es kann jedoch auch von der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase zu GMP wiederaufgebaut werden. Unter Normalbedingungen überwiegt der Abbau zu Xanthin die Reutilisierung zu GMP bei weitem. Die Hemmung der Xanthinoxidase durch Allopurinol hat auf die Verstoffwechslung von Guanin offensichtlich keinen Einfluß: Selbst bei vollständigem Fehlen der Xanthinoxidase (Xanthinurie) wird intravenös verabreichtes Guanin (2,1 μmol) innerhalb von 24 Stunden zu 63 % ausgeschieden, Hypoxanthin dagegen nur zu 16 % und Adenin nur zu 1 % (Ayvazian und Skupp, 1965). Akkumulierendes Xanthin hemmt somit die Guanase offensichtlich nicht, so daß die Gabe von Allopurinol zu keiner Akkumulation von Guanin führt. Infolgedessen ist offensichtlich auch der Abbau und damit die Absorption von Guanosin im Gegensatz zu der von Inosin in Gegenwart von Allopurinol nicht behindert: Während nach Gabe von AMP, Adenosin, IMP und Inosin nur 15,6 - 29,3 % der Einzeldosis im Urin wiedergefunden wurden, betrug die Wiederfindungsquote bei Guanosin und GMP 55,4 bzw. 46,6 % (s. Tab. 20). Diese Wiederfindungsquoten wurden für die Versuchstage 19 und 20 berechnet, an denen die ursprüngliche Guanosindosis von 8,8 auf 5,9 mmol/die und die GMP-Dosis von 8,0 auf 5,3 mmol/die reduziert worden war. Die zur Dosisreduktion führenden Beschwerden der Versuchspersonen wurden höchstwahrscheinlich durch auskristallisierendes Xanthin verursacht, das sich auch in den Urinsammelgefäßen in großen Mengen absetzte und

nur teilweise wieder in Lösung gebracht werden konnte: die an den Tagen 14 - 18 gemessene Ausscheidung an Oxipurinen ist daher als unvollständig zu betrachten. Tatsächlich lag nach Gabe von 8,8 mmol Guanosin/die die durchschnittliche Oxipurinausscheidung an den Versuchstagen 14 - 18 mit 4,178 mmol/die unter der durchschnittlichen Ausscheidung der Tage 19 und 20, die nach Gabe von 5,9 mmol/die 4,774 mmol betrug; im Falle von GMP lag die durchschnittliche Oxipurinausscheidung an den Versuchstagen 14 - 18 (8 mmol GMP/die) mit 5,04 mmol/die nur relativ gering über dem Durchschnitt der Tage 19 und 20 (5,3 mmol GMP/die) von 4,69 mmol/die (vgl. Tab. 19). Im Hinblick auf die geringe Reutilisierung von oral verabreichten Guaninderivaten (s.o. S.8.) dürfte die Wiederfindungsquote von Guanosin und GMP weitgehend ihrer Absorptionsquote entsprechen, während man bei den in Form von Inosin absorbierten Purinen zur Wiederfindungsquote noch den reutilisierten Anteil hinzurechnen muß. Die geringe Reutilisierung oral verabreichter Guaninverbindungen bedeutet andererseits einen nur geringen PRPP-Verbrauch, der somit nicht die Ursache der starken Reduktion der Orotacid- und Orotidinurie durch GMP und Guanosin darstellen dürfte. Entsprechend überwiegt hier auch, im Gegensatz zu Adenin, die Reduktion der Orotacidurie: Nach GMP ging sie um 85 %, nach Guanosin um 42 % zurück; die Orotidinurie nahm dagegen nach GMP nur um 34 % ab, während sie nach Guanosin sogar um 26 % anstieg. Die Gesamtausscheidung von Orotsäure und Orotidin verringerte sich damit nach Gabe von GMP um 59 %, nach Guanosin um 12 % (s.Tab. 12). Wie bei den Untersuchungen von Gröbner und Zöllner (1983), die nach Gabe von $3 \times 0,93$ mmol GMP/die einen Rückgang der Orotacid- und Orotidinurie um 50 % beobachtet hatten, bestätigte sich somit auch in der vorliegenden Arbeit der außerordentlich starke Effekt selbst relativ kleiner GMP-Dosen auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie. Der deutlich schwächere Gesamteffekt von Guanosin wurde auch von Gröbner und Zöllner beobachtet: Die gegenüber GMP 3,8fach höhere Guanosin-Dosis von $3 \times 3,53$ mmol/die reduzierte die Orotacid- und Orotidinurie nur um 36 % (s. Tab. 1). Nach dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist das zumindest teilweise auf einen deutlichen Anstieg der Orotidinausscheidung zurückzuführen.

Wie das Tagesprofil der Orotsäure- und Orotidinausscheidung zeigt (s. Abb. 8), wird die Orotidinausscheidung nach Gabe von Guanosin zunächst (Fraktion II) ähnlich stark reduziert wie die Orotsäureausscheidung (Fraktion I und II); in Fraktion III (9 - 13 Stunden nach Purineinnahme) kommt es dann jedoch ebenso wie nach Gabe von AMP, Adenosin, Inosin oder IMP zu einem starken Anstieg der Orotacidurie, der im Falle von Guanosin von einem noch stärkeren und insbesondere auch in Fraktion IV anhaltenden Anstieg der Orotidinausscheidung begleitet wird (s. Abb. 8). Wie weiter oben dargestellt wurde (s. S. 101), könnte dem starken Anstieg der Orotsäureausscheidung in Fraktion III eine kompensatorische Aktivitätssteigerung der Carbamylphosphatsynthetase zugrundeliegen: Während in Fraktion I und II die Orotsäuresynthese offensichtlich durch die Bildung einer großen Menge Xanthin gehemmt wird - die Xanthinausscheidung beträgt hier 262 bzw. 124 $\mu\text{mol/Stunde}$ (s. Tab. 21) - dürfte sie in Fraktion III durch eine erniedrigte UTP-Konzentration und einen erhöhten PRPP-Spiegel stimuliert werden. Letzterer könnte aus dem geringen PRPP-Verbrauch bei der Reutilisierung von Guanin und der Bildung von PRPP aus dem Riboseanteil von Guanosin resultieren (s.o. S. 88); diese stimulierenden Faktoren müßten dabei die hemmende Wirkung von Xanthin, das in Fraktion III noch in einer Menge von 78 $\mu\text{mol/Stunde}$ ausgeschieden wird (s. Tab. 21), kompensieren. Erst in Fraktion IV (13 - 24 Stunden nach Guanosineinnahme) geht die Xanthinausscheidung mit 25 $\mu\text{mol/Stunde}$ in die Größenordnung der Vorperiode zurück (16 $\mu\text{mol/Stunde}$, s. Tab. 21). Der in dieser Fraktion zu beobachtende erneute starke Abfall der Orotsäureausscheidung bei gleichzeitig erhöhter Orotidinausscheidung dürfte durch die Normalisierung der UTP-Konzentration und den erhöhten PRPP-Spiegel verursacht werden, der das Gleichgewicht zwischen Orotsäure und OMP zur Seite von OMP verschiebt, aus dem schließlich Orotidin freigesetzt wird.

GMP wird nach seiner Absorption annähernd quantitativ in Xanthin umgewandelt und als solches ausgeschieden (vgl. Tab. 20 und 21); die Reduktion der Orotacid- und Orotidinurie muß daher ebenso wie im Falle von Guanosin einem direkten Effekt von Xanthin zugeschrieben werden. Das Tagesprofil der Orotsäure- und Orotidinaus-

scheidung nach Gabe von GMP (s. Abb. 9) unterscheidet sich von dem nach Gabe von Guanosin (s. Abb. 8) hauptsächlich durch den fehlenden Anstieg der Orotsäure- und Orotidinausscheidung in Fraktion III, der nicht erklärt werden kann. In Fraktion IV entsprechen sich die Tagesprofile dann wieder exakt: es findet sich eine deutlich erniedrigte Orotsäureausscheidung bei gleichzeitig erhöhter Orotidinausscheidung. Diese Konstellation weist, wie bereits am Beispiel von Guanosin dargelegt, auf eine erhöhte PRPP-Konzentration mit Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen Orotsäure und OMP hin.

Bei der Diskussion der Mechanismen, durch die die verabreichten Purine die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie reduzieren könnten, wurden wiederholt Anhaltspunkte dafür gefunden, daß das Stoffwechselendprodukte Xanthin möglicherweise einen entscheidenden Faktor bei der Hemmung der Orotsäurebildung darstellt (s.o. S. 92, 95, 101). Diese Vermutung wurde dadurch bestätigt, daß GMP, das die Orotacid- und Orotidinurie so wirkungsvoll senkt, nach seiner intestinalen Absorption nicht in stoffwechselaktive Metaboliten umgesetzt, sondern direkt zum Stoffwechselendprodukt Xanthin abgebaut wird (s.o. S. 8). Im Gegensatz hierzu steht die Beobachtung von Simmonds et al. (1973a), wonach bei Schweinen unter einer Behandlung mit 2,2 mmol Allopurinol/kg/24 Stunden die Zulage von 1 mmol Guanin/kg/24 Stunden zu einer purinfreien Kost (auf Milchbasis wie in vorliegender Arbeit) keine Reduktion der Orotacid- und Orotidinurie bewirkte. Da im Gegensatz zu den Untersuchungen von Gröbner und Zöllner (1983) Guanin nicht in Form der wasserunlöslichen und daher wahrscheinlich nicht resorbierbaren freien Basen sondern als Hydrochlorid verabreicht wurde, von dem bis zu 50 % der Dosis absorbiert wurden, kam es zu einem Anstieg der Xanthin-Bildung bzw. -Ausscheidung von bis zu 4,6 mmol/24 Stunden, d.h. um knapp das Doppelte des in der vorliegenden Arbeit nach Gabe von GMP beobachteten Anstiegs der Xanthin-Ausscheidung. Es ist hierbei jedoch zu berücksichtigen, daß bei den Schweinen die Xanthinausscheidung bereits vor Zulage von Guanin 2,36 mmol/die betrug, was auf die im Vergleich mit der vorliegenden Arbeit ca. 28 fach höhere Allopurinoldosis zurückzu-

führen ist. Nachdem das Gewicht der Schweine zwischen 20 - 25 und 60 kg lag, dürfte dieser Ausscheidungswert, bezogen auf das höhere Körpergewicht der Versuchspersonen, der in vorliegender Arbeit nach Gabe von GMP oder Guanosin erreichten Xanthinausscheidung (3,232 bzw. 2,626 mmol/die, s. Tab. 19) entsprechen. Da bereits sehr kleine Dosen von GMP eine starke Reduktion der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie bewirken - Gröbner und Zöllner (1983) beobachteten nach $3 \times 0,93$ mmol GMP/die eine Abnahme um 50 % - und die in der vorliegenden Arbeit verabreichten höheren Dosen von 8 bzw. 5,3 mmol GMP/die die Orotacid- und Orotidinurie nicht wesentlich weiter senken konnten, muß man wohl annehmen, daß die Hemmung der Orotsäuresynthese durch Xanthin bereits bei relativ gering vermehrter Xanthinbildung maximal ausgeprägt ist und durch eine höhere Xanthinbildung nicht mehr gesteigert werden kann. Demzufolge dürfte der fehlende Effekt der Guanin-Gabe auf die Orotacid- und Orotidinurie der Schweine damit zu erklären sein, daß die Orotsäuresynthese durch die schon vor der Guanin-Zulage hohe Xanthinbildung maximal gehemmt ist.

V. 3. EINFLUSS DER VERABREICHTEN PURINE AUF ABSORPTION UND METABOLISIERUNG VON ALLOPURINOL

Wie im vorausgehenden Abschnitt ausführlich dargestellt wurde, weisen die sehr unterschiedlichen Veränderungen von Gesamtmenge und Tagesprofil der Orotsäure- und Orotidinausscheidung (vgl. Tab. 12 und Abb. 8 - 10) nach Gabe der einzelnen Purine darauf hin, daß an der Reduktion der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie mehrere Mechanismen beteiligt sind. Für eine Abnahme der der Orotacid- und Orotidinurie zugrundeliegenden Hemmung der ODC durch verminderte Bildung der Nucleotid-Derivate von Allopurinol und Oxipurinol ergaben sich dabei keine sicheren Anhaltspunkte: So kam es nach Gabe von Adenin zunächst zu einem Anstieg der Orotsäureausscheidung (s. Abb. 10). Bei Einnahme von AMP, Adenosin, IMP, Inosin oder Guanosin folgte auf eine anfängliche Reduktion eine vorübergehende starke Erhöhung der Orotsäureausscheidung (s. Abb. 8), die als kompensatorische Steigerung der Orotsäuresynthese imponiert. Diese wäre jedoch im Falle einer verminderten ODC-Hemmung unverständlich. Allein das Tagesprofil der Orotsäure- und Orotidinausscheidung nach Verabreichung von Hypoxanthin (s. Abb. 10) ließe sich problemlos mit einer Reduzierung der ODC-Hemmung vereinbaren. Hypoxanthin wäre aufgrund seiner zu Allopurinol analogen Struktur auch am ehesten dazu geeignet, die intestinale Absorption von Allopurinol und seine Umwandlung in Allopurinol-Ribotid zu behindern. Die Bestimmung der Gesamtausscheidung von unmetabolisiertem Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten Oxipurinol und Allopurinol-Ribosid ergab jedoch insbesondere im Falle von Hypoxanthin einen leichten Anstieg um 5,1 % in der 3. Versuchsperiode; bei 6 weiteren Versuchspersonen kam es ebenfalls nach Purinzulage zu einem Anstieg der Gesamtausscheidung von Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten um 0,7 - 21,3 %. Lediglich bei zwei Versuchspersonen wurde eine Abnahme um 5,8 % (Adenin 1 x/die) bzw. 13,2 % (GMP) beobachtet (s. Tab. 24), die geringfügig zur Senkung der Orotacid- und Orotidinurie beitragen haben könnte. Während somit nur bei 2 von 9 Versuchspersonen eine geringe Hemmung der intestinalen Allopurinol-Absorption durch die verabreichten Purine nachzuweisen war, hatten

letztere eine ganz ausgeprägte Wirkung auf die Ausscheidung bzw. Bildung von Allopurinol-Ribosid (s. Tab. 25): Bei gleichzeitiger Einnahme von Allopurinol und Purinen (Tag 16 - 20) wurde die Ausscheidung von Allopurinol-Ribosid um 36,2 % - 100 % reduziert. Die geringste Wirkung zeigten dabei Guanosin (-36 %) und GMP (-51,3 %). Da Allopurinol-Ribosid in vivo nicht direkt durch die Purinnucleosidphosphorylase synthetisiert wird, sondern als Abbauprodukt von Allopurinol-Ribotid entsteht (Reiter et al., 1983, 1986a), ist die Abnahme seiner Ausscheidung nach Gabe von Guanosin oder GMP auf die kompetitive Hemmung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase durch Guanin und Xanthin zurückzuführen: Die K_i -Werte betragen 1,8 bzw. 250 μM (Krenitsky et al., 1969). Die relativ geringe Reduktion der Allopurinol-Ribotid-Bildung beruht demnach auf dem raschen Abbau von freigesetztem Guanin durch die sehr aktive Guanase von Dünndarm und Leber (s.o. S. 8) und dem hohen K_i -Wert des in großer Menge entstehenden Xanthins. Der stärkere Effekt der übrigen Purine dürfte sich damit erklären, daß sie zu einem großen Teil in Hypoxanthin umgewandelt werden, das mit einem K_i -Wert von 2,4 μM die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase ähnlich stark hemmt wie Guanin (Krenitsky et al., 1969), jedoch im Gegensatz zu diesem in Gegenwart von Allopurinol vermindert abgebaut wird. Durch die Hemmung des Hypoxanthin-Abbaus wird Hypoxanthin auch wesentlich stärker reutilisiert als Guanin, so daß zur kompetitiven Hemmung der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase der größere PRPP-Verbrauch als weitere Ursache der verminderten Allopurinol-Ribotid-Bildung hinzukommt. Der maximale PRPP-Verbrauch und die sehr hohe Bildungsrate von Hypoxanthin nach Gabe von Adenin sind die Ursache dafür, daß dieses Purin die Allopurinol-Ribotid-Synthese in beiden Versuchen am stärksten reduziert (-100 bzw. -95 %). Die vollständige Unterdrückung der Allopurinol-Ribotid-Bildung durch Adenin ging in Versuch I jedoch nur mit einer geringen Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie einher (-13 %, s. Tab. 12). An den Versuchstagen 14 und 15, an denen die Purine 5 Stunden nach Allopurinol verabreicht wurden, fand sich nach Gabe von Adenin oder Hypoxanthin keine Abnahme der Allopurinol-Ribosid-Ausscheidung (s. Tab. 25), während die Orotacid- und Orotidinurie ähnlich

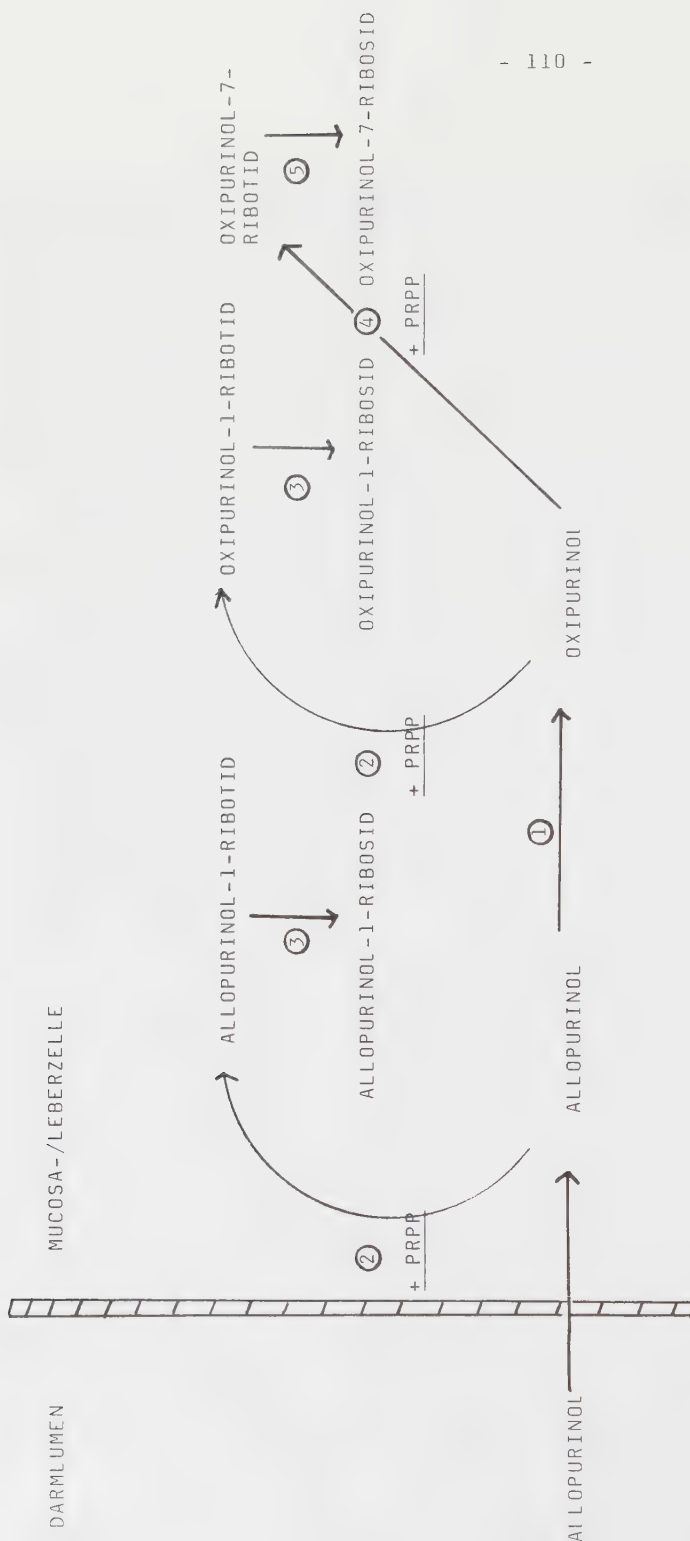


Abb. 20: Stoffwechselwege von oral verabreichtem Allopurinol.

Beteiligte Enzyme:

- ① Xanthinoxidase
- ② Hypoxanthin-guanin-phosphoribosyltransferase
- ③ 5'-Nucleotidase (und andere Phosphatasen)
- ④ Orotsäurephosphoribosyltransferase
- ⑤ Pyrimidin-5-Nucleotidase (?)

starkt reduziert wurde wie an den Versuchstagen 16 - 20, an denen Allopurinol und Purine gleichzeitig eingenommen wurden (s. Tab. 10). Aus diesen Beobachtungen muß man schließen, daß die Bildung von Allopurinol-Ribotid in vivo keine größere Bedeutung für die Hemmung der ODC und damit die Entstehung der Allopurinol-induzierter Orotacid- und Orotidinurie haben dürfte, was hauptsächlich wohl auf seinen relativ hohen K_i -Wert von $1 \mu\text{M}$ zurückzuführen ist (Fyfe et al., 1973). Die Reduktion der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie durch oral verabreichte Purine beruht somit nicht auf ihrer ausgeprägten Hemmung der Bildung von Allopurinol-Ribotid. Daß die Hemmung der ODC und damit die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie nicht auf der Bildung von Allopurinol-Ribotid sondern der Synthese von Oxipurinol-Ribotiden beruht, wird in vorliegender Arbeit auch daran ersichtlich, daß die Orotsäure- und Orotidinausscheidung während der ersten 3 - 4 Tage der Allopurinoleinnahme (7. bis 9./10. Versuchstag) kontinuierlich anstieg (s. Tab. 8 und 9). An diesen Versuchstagen stieg auch die Oxipurinolausscheidung kontinuierlich an, entsprechend der Akkumulierung von Oxipurinol im Organismus, während die Allopurinol-Ribosid-Ausscheidung keine ansteigende Tendenz zeigte (s. Tab. 22). Im gleichen Sinne ist auch die Beobachtung von Wood et al. (1974) zu bewerten, wonach das Diuretikum Chlorothiazid die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie verstärkt: Da die Mechanismen der renalen Ausscheidung von Oxipurinol denen von Harnsäure entsprechen, wird die Oxipurinol-ausscheidung durch das Diuretikum ebenso gehemmt wie die Harnsäureausscheidung, so daß es zu einer vermehrten Akkumulierung von Oxipurinol mit gesteigerter Bildung seiner Nucleotid-Derivate kommt.

Die Möglichkeit, daß oral verabreichte Purine nicht nur die Bildung von Allopurinol-Ribotid, sondern auch die Synthese der Oxipurinol-Ribotide hemmen könnten, ließ sich in vorliegender Arbeit aufgrund der zu geringen Trennleistung des HPLC-Systems nicht abklären. Nach Extraktion der Nucleoside mittels Boronat-Affinitätsgel und unter Verwendung einer C18-Reversed-Phase-HPLC-Säule konnten Reiter et al. (1986b) in Urinen, die in vorliegender Ar-

beit gesammelt worden waren, die Ausscheidung von Oxipurinol-7-Ribosid und erstmals beim Menschen auch von Oxipurinol-1-Ribosid bestimmen. Das Ergebnis ist in Tab. 26 wiedergegeben. Man sieht dort, daß die Ausscheidung von Oxipurinol-1-Ribosid, die durchschnittlich 3,1 % (2,1 - 4,8 %) der Allopurinol-1-Ribosid-Ausscheidung beträgt, durch die verabreichten Purine mit Ausnahme von GMP im gleichen Ausmaß reduziert wird wie die Ausscheidung von Allopurinol-1-Ribosid. Oxipurinol-1-Ribosid stellt das Abbauprodukt von Oxipurinol-1-Ribotid dar, dem wirkungsvollsten Hemmstoff der ODC ($K_i = 0,5 \text{ nM}$). Nachdem jedoch die vollständige Unterdrückung seiner Bildung durch die einmalige Gabe von Adenin in Versuch I mit einem nur geringen Rückgang der Orotacid- und Orotidinurie (-13 %, s. Tab. 12) einhergeht, die 68 %ige Hemmung seiner Bildung durch einmalige Gabe von Adenosin keinen Rückgang der Orotacid- und Orotidinurie bewirkt usw., muß man wohl annehmen, daß Oxipurinol-1-Ribotid ebenso wie Allopurinol-1-Ribotid nicht wesentlich zur ODC-Hemmung in vivo beiträgt. Die vollständige Unterdrückung der Oxipurinol-1-Ribosid-bzw. -Ribotid-Bildung durch tägliche Einzeldosen von Adenin sowie die knapp dreifach höhere Bildungsrate bei Gabe von Allopurinol in täglich 3 Teildosen (Versuch II) sprechen dafür, daß Oxipurinol-1-Ribotid nicht permanent über 24 Stunden gebildet werden kann. Vielmehr scheinen für seine Synthese hohe Oxipurinol-Konzentrationen erforderlich zu sein, die höchstwahrscheinlich nur unmittelbar nach Allopurinoleinnahme, während der Zeitspanne der Oxipurinolbildung, und nur am Ort der Oxipurinolbildung, d.h. in Dünndarm und Leber, auftreten. Zur zeitlichen und örtlichen Beschränkung seiner Bildung müßte dann noch eine kurze Halbwertszeit von Oxipurinol-1-Ribotid kommen, um seine Wirkungslosigkeit in vivo zu erklären. Die Halbwertszeit von Oxipurinol-1-Ribotid in vivo kann beim Menschen nicht bestimmt werden. Nelson et al. (1973) haben den Zeitverlauf der Gewebespiegel der Allopurinol- und Oxipurinol-Ribotide nach intravenöser Gabe von ^{14}C -Allopurinol bei Ratten untersucht; aus ihren Daten läßt sich für Oxipurinol eine Serumhalbwertszeit von ca. einer Stunde berechnen (beim Menschen beträgt sie 18 - 30 Stunden) und das Maximum des Serumspiegels ca. 90 Minuten nach Injektion vermuten. Aufgrund der kurzen Serumhalb-

Tab. 26: Ausscheidung von Allopurinol- (vgl. Tab. 22 und 25) und Oxipurinol-Ribosiden (nach Reiter et al., 1986 b) in μmol /die während der zweiten (purinfreie Diät) und dritten (Purinzulage) Versuchperiode.

Versuchs- person	Purin- zulage	Ausscheidung von Allopurinol -l- Ribosid 2. Periode/3. Periode Differenz	Ausscheidung von Oxipurinol-l- Ribosid 2. Periode/3. Periode Differenz	Ausscheidung von Oxipurinol-7- Ribosid 2. Periode/3. Periode Differenz			
Versuch I							
7	GMP	414/203	- 211 (- 51 %)	9,1/11,1	+ 2,0 (+ 22 %)	52,3/46,3	-6,0 (-11 %)
8	Hypoxanthin	460/ 67	- 393 (- 85 %)	11,9/ 3,3	- 8,6 (- 72 %)	22,6/17,9	-4,7 (-21 %)
4	Adenin	496/ 0	- 496 (-100 %)	10,5/ 0	-10,5 (-100 %)	32,0/27,4	-4,6 (-14 %)
6	Adenosin	523/155	- 368 (- 70 %)	18,2/ 5,8	-12,4 (- 68 %)	39,2/44	+4,8 (+12 %)
Versuch II							
2	Adenin	1.096/ 57	-1.039 (- 95 %)	32,5/ 0	-32,5 (-100 %)	48,0/51,8	+3,8 (+ 8 %)
9	Adenosin	773/ 98	- 675 (- 87 %)	37,3/ 4,1	-33,2 (- 89 %)	31,9/36	+4,1 (+13 %)
8	AMP	893/160	- 733 (- 82 %)	31,7/ 4,5	-27,2 (- 86 %)	26,7/25,6	-1,1 (- 4 %)

wertszeit von Oxipurinol kann bei der Ratte die Synthese von Oxipurinol-Ribotiden nur relativ kurzfristig um den Zeitpunkt des maximalen Oxipurinol-Serumspiegels erfolgen, so daß aus dem Abfall der Gewebespiegel auf die Halbwertszeit der Oxipurinol-Ribotide geschlossen werden kann. Für Oxipurinol-1-Ribotid ergibt sich so aus den angegebenen 3- und 6-Stunden-Werten eine Halbwertszeit zwischen 60 und 120 Minuten in der Rattenleber.

Nachdem weder Allopurinol- noch Oxipurinol-1-Ribotid einen größeren Beitrag zur Hemmung der ODC in vivo zu leisten scheinen, muß letztere hauptsächlich durch Oxipurinol-7-Ribotid erfolgen, ein Pyrimidin-analoges Nucleotid mit einer K_i von 40 nM (Fyfe et al., 1973). Die Ausscheidung seines Abbauprodukts Oxipurinol-7-Ribosid betrug in Versuch I und II durchschnittlich jeweils ca. 35 $\mu\text{mol/die}$ und lag damit in der Größenordnung der Oxipurinol-1-Ribosid-Ausscheidung in Versuch II. Die Unabhängigkeit der Oxipurinol-7-Ribosid-Ausscheidung von der Anzahl der täglichen Allopurinol-Dosen spricht dafür, daß Oxipurinol-7-Ribotid im Gegensatz zu Oxipurinol-1-Ribotid kontinuierlich gebildet werden dürfte, worauf wohl seine dauerhafte Hemmung der ODC beruht; die Halbwertszeit im Gewebe ist zumindest bei der Ratte nämlich ebenso kurz wie die von Oxipurinol-1-Ribotid (s.o.). Unter Purinzulage nahm die Ausscheidung von Oxipurinol-7-Ribosid in der 3. Versuchsperiode bei 4 Versuchspersonen geringfügig ab (-4 bis -21 %), während sie bei 3 weiteren Versuchspersonen gering anstieg (+8 bis +13 %). Die Abnahme der Oxipurinol-7-Ribosid-Ausscheidung korreliert nicht mit der Senkung der Orotacid- und Orotidinurie (vgl. Tab. 26 mit Tab. 12); die bei einigen Versuchspersonen beobachtete geringe Abnahme der Oxipurinol-7-Ribotid-Bildung kann somit höchstens einen Teilfaktor bei der Reduktion der Allopurinol-induzierten Orotacid- und Orotidinurie durch oral verabreichte Purine darstellen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Als Nebenwirkung der uricostatischen Therapie mit Allopurinol kommt es zu einer Hemmung der Pyrimidinsynthese de novo: Nucleotid-analoge Metabolite von Allopurinol bzw. Oxipurinol hemmen die Orotidinmonophosphat (OMP)-Decarboxylase (ODC), was zu einer stark vermehrten Ausscheidung des OMP-Abbauprodukts Orotidin und der OMP-Vorstufe Orotsäure führt. Diese Orotacid- und Orotidinurie ist am ausgeprägtesten unter purinfreier Diät, während sie durch oral verabreichte Purinverbindungen unterschiedlich stark reduziert wird. Als mögliche Mechanismen dieses Purineffekts auf die Pyrimidinsynthese wurden bisher diskutiert: eine direkte Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase oder der Dihydroorotase; der Verbrauch von Phosphoribosylpyrophosphat (PRPP) bei der Reutilisierung von Adenin oder Hypoxanthin mit resultierender indirekter Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase und der Orotsäurephosphoribosyltransferase (OPRT); eine Hemmung der renalen Ausscheidung von Orotsäure sowie eine verminderte Bildung der Nucleotid-analogen Metaboliten von Allopurinol bzw. Oxipurinol. Die sehr unterschiedliche Wirkung der einzelnen Purinverbindungen wurde z. T. auf unterschiedliche intestinale Absorptionsquoten zurückgeführt (Zöllner und Gröbner, 1977; Gröbner und Zöllner, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, anhand eines Ernährungsversuchs Anhaltspunkte für die Relevanz der genannten Mechanismen zu gewinnen: 9 Versuchspersonen erhielten 3 Wochen lang eine purinfreie Formeldiät; in der 2. und 3. Woche wurde Allopurinol in einer Dosis von 5 mmol/l,73 m² Körperoberfläche und in der 3. Woche zusätzlich je eine Purinverbindung in einer Dosis von 7,5 mmol/l,73 m² Körperoberfläche verabreicht (die Dosis von GMP und Guanosin mußte wegen Nierenbeschwerden infolge auskristallisierenden Xanthins um ein Drittel reduziert werden). In den täglich gesammelten 24-Stunden-Urinen wurde mittels HPLC die Ausscheidung der Pyrimidinmetaboliten Orotsäure und Orotidin, der Purinmetaboliten Hypoxanthin, Xanthin und Harnsäure, von Adenin sowie von Allopurinol und seinen Hauptmetaboliten Oxipurinol und Allopurinol-1-Ribosid gemessen.

Die getrennte Bestimmung der Orotsäure- und Orotidinausscheidung zeigte bei den einzelnen Versuchspersonen sehr unterschiedliche Veränderungen der Tagesausscheidung und der Tagesausscheidungsprofile dieser Pyrimidinmetaboliten, so daß ein einheitlicher Wirkmechanismus der einzelnen Purine ausgeschlossen werden kann.

Eine positive Korrelation zwischen der Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie und der intestinalen Absorptionsquote ließ sich nicht eindeutig nachweisen: Die Wiederfindungsrate von AMP und Adenosin im Urin ließ sich durch Aufteilung der Dosis in 3 Teildosen von 18 bzw. 15,6 % auf 40,3 bzw. 41,5 % steigern, was für eine Zunahme der intestinalen Absorptionsquote spricht; die Abnahme der Orotacid- und Orotidinurie war bei Gabe von AMP jedoch in beiden Fällen gleich groß (-22 %). Die hohe Einzeldosis von Adenosin (1 x 9 mmol/die) reduzierte die Orotsäure- und Orotidinausscheidung am ersten Tag der Einnahme um 44,2 %; an den folgenden Tagen dieser Versuchsperiode stieg die Orotsäure- und Orotidinausscheidung jedoch kontinuierlich an und lag am siebten Tag der Einnahme um 44 % über dem Durchschnittswert der Vorperiode, so daß die hohe Einzeldosis von Adenosin im Durchschnitt wirkungslos erschien. Die Verabreichung von Adenosin in 3 kleineren Teildosen (3 x 2,9 mmol/die) reduzierte die Orotacid- und Orotidinurie dagegen um durchschnittlich 53 %. Im Falle von Adenin wurden nach Gabe einer hohen Einzeldosis (1 x 8,3 mmol/die) 74,5 %, nach Gabe von 3 kleineren Teildosen (3 x 2,8 mmol/die) jedoch nur 51,6 % der Dosis im Urin wiedergefunden; die geringere Wiederfindungsrate spricht hier nicht für eine niedrigere Absorptionsquote sondern für eine höhergradige Reutilisierung der kleineren Dosen. Entsprechend hatte die hohe Einzeldosis von Adenin einen geringeren Effekt auf die Orotacid- und Orotidinurie als die wiederholte Gabe kleinerer Teildosen (-13 gegenüber -47 %).

Am geringeren Effekt der hohen Einzeldosis von Adenin war ein im Tagesprofil nachgewiesener vorübergehender Anstieg der Orotsäureausscheidung in den ersten 5 Stunden nach Adenineinnahme beteiligt: Nachdem gleichzeitig im Vergleich zur Vorperiode die 40fache Menge Hypoxanthin, die 5fache Menge Xanthin und die

2fache Menge Harnsäure ausgeschieden wurde, ist eine direkte Hemmung der Carbamylphosphatsynthetase, der Dihydroorotase und der renalen Orotsäureausscheidung durch diese Purinmetaboliten wenig wahrscheinlich.

Adenin wird wesentlich mehr als alle anderen Purine zur Synthese von Nucleotiden reutilisiert, was mit einem entsprechend großen PRPP-Verbrauch einhergeht. Nach Gabe der hohen Einzeldosis ($1 \times 8,3$ mmol/die) wurde in der vorliegenden Arbeit die maximale Reutilisierungsrate von Adenin überschritten, so daß eine große Menge unmetabolisierten Adenins im Urin ausgeschieden wurde. Der hierbei erreichte maximale PRPP-Verbrauch führte jedoch nicht zur erwarteten Abnahme, sondern zur oben erwähnten vorübergehenden Zunahme der Orotacidurie: Vermutlich wird nach hohen Adenindosen vermehrt AMP in ATP umgewandelt, das die Carbamylphosphatsynthetase stimuliert und die fehlende Aktivierung des Enzyms durch PRPP ausgleicht. Der PRPP-Mangel äußert sich in dieser Situation in einem verminderten Orotsäureumsatz durch die OPRT und infolgedessen in der beobachteten Mehrausscheidung von Orotsäure.

Die wiederholte Gabe kleinerer Adenindosen ($3 \times 2,8$ mmol/die) hatte in der vorliegenden Arbeit einen wesentlich stärkeren Effekt auf die Orotacid- und Orotidinurie (-47 %) als die wiederholte Gabe größerer Adenindosen (-9 % nach $3 \times 7,4$ mmol/die) bei Gröbner und Zöllner (1983); es besteht hier somit offensichtlich ein umgekehrtes Dosis-Wirkungsverhältnis. An ihm ist neben der unterschiedlichen Reutilisierungsrate und ATP-Bildung (s.o.) möglicherweise auch ein dosisabhängiger Unterschied der Adenin-Katabolisierung beteiligt. Während die große Einzeldosis von Adenin hauptsächlich zu Hypoxanthin abgebaut wurde (41,6 % der Mehrausscheidung von Purinen), überwog nach Gabe der kleineren Teildosen Xanthin (52,9 % der Mehrausscheidung). Xanthin war auch der Hauptmetabolit von GMP (96,9 % der Mehrausscheidung von Purinen), das die stärkste Reduktion der Orotacid- und Orotidinurie bewirkte (-59 %). Nachdem GMP über Guanin sehr rasch zu Xanthin abgebaut wird, das nicht zur Nucleotidsynthese wiederverwendet wird, kann der ausgeprägte Effekt von GMP nicht auf einem Verbrauch von PRPP

beruhen, sondern muß einem direkten Effekt von Xanthin zugeschrieben werden. Für diese Hypothese spricht auch, daß bei allen verabreichten Purinen die sehr unterschiedlichen Veränderungen der Tagesprofile der Orotsäure- und Orotidinausscheidung am ehesten mit dem Tagesprofil der Xanthinausscheidung zu korrelieren waren.

Für den Angriffspunkt des Stoffwechselendprodukts Xanthin in der Pyrimidinsynthese de-novo konnte in der vorliegenden Arbeit kein sicherer Hinweis gefunden werden. Insbesondere dürfte er nicht in einer Beeinflussung des Allopurinolstoffwechsels liegen: Eine Hemmung der Allopurinolabsorption durch Nahrungspurine konnte ausgeschlossen werden. Nach Gabe von Adenin und Hypoxanthin bzw. ihren Derivaten ließ sich zwar eine ausgeprägte Hemmung der Allopurinolribosidbildung nachweisen, die jedoch nicht mit dem Rückgang der Orotacid- und Orotidinurie korreliert war. Allopurinolribosid stellt zwar das Abbauprodukt des ODC-Hemmers Allopurinolribotid dar, der jedoch aufgrund eines relativ hohen K_i -Wertes keine Bedeutung für die Allopurinol-induzierte Hemmung der ODC in vivo zu haben scheint. Letztere kommt offensichtlich nur durch Ribotide von Oxipurinol zustande. Weiterführende Arbeiten haben gezeigt, daß die Ausscheidung des Abbauproduktes Oxipurinol-7-Ribosid durch die verabreichten Purine nicht reduziert wurde, während die Ausscheidung von Oxipurinol-1-Ribosid im gleichen Ausmaß abnahm wie die Ausscheidung von Allopurinol-1-Ribosid und daher ebenfalls nicht mit dem Rückgang der Orotacid- und Orotidinurie korreliert war (Reiter et al., 1986 b).

Verzeichnis der gebrauchten Abkürzungen:

Ad	Adenin
AMP	Adenosinmonophosphat
A	Allopurinol
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
AR	Allopurinolribosid
ATP	Adenosintriphosphat
CAP II	Carbamylphosphatsynthetase II
GMP	Guanosinmonophosphat
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	High pressure liquid chromatography
HS	Harnsäure
HX	Hypoxanthin
IMP	Inosinmonophosphat
OMP	Orotidinmonophosphat
ODC	OMP-Decarboxylase
O	Oxipurinol
OPRT	Orotsäurephosphoribosyltransferase
OS	Orotsäure
OT	Orotidin
PNP	Purinnucleosidphosphorylase
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
UMP	Uridinmonophosphat
UTP	Uridintriphosphat
VP	Versuchsperson
X	Xanthin
XMP	Xanthosinmonophosphat

LITERATURVERZEICHNIS

- Ayvazian J.H., Skupp S. (1965) The study of purine utilization and excretion in a xanthinuric man. J. Clin. Invest. 44, 1248 - 1260
- Bachmann C., Colombo J.P. (1980) Determination of orotic acid in children's urine. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 18, 293 - 295
- Bagnara A.S., Letter A.A., Henderson J.F. (1974) Multiple mechanisms of regulation of purine biosynthesis de novo in intact tumor cells. Biochim. Biophys. Acta 374, 259 - 270
- Bartlett G.R. (1977) Metabolism by man of intravenously administered adenine. Transfusion 17, 367 - 373
- Becroft D.M.O., Phillips L.I. (1965) Hereditary orotic aciduria and megaloblastic anaemia: a second case, with response to uridine. Brit. Med. J. 1, 547 - 552.
- Bendich A., Brown G.B., Philips F.S., Ihiersch J.B. (1950) The direct oxidation of adenine in vivo. J. Biol. Chem. 183, 267 - 277
- Brenton D.P., Astrin K.H., Cruikshank M.K., Seegmiller J.E. (1977) Measurement of free nucleotides in cultured human lymphoid cells using high pressure liquid chromatography. Biochem. Med. 17, 231 - 247
- Bresnick E., Blatchford K. (1964) Inhibition of dihydroorotase by purines and pyrimidines. Biochim. Biophys. Acta 81, 150 - 157
- Brown G.B., Roll P.M., Plentl A.A., Cavaiieri L.F. (1946) The utilization of adenine for nucleic acid synthesis and as a precursor of guanine. J. Biol. Chem. 172, 469 - 484
- Burridge P.W., Woods R.A., Henderson J.F. (1976) Utilization of

dietary nucleic acid purines for nucleotide and nucleic acid synthesis in the mouse. Can. J. Biochem. 54, 500 - 506

Cameron J.S., Simmonds H.A., Cadenhead A., Farebrother D. (1977) Metabolism of intravenous adenine in the pig. Adv. Exp. Med. Biol. 76 A, 196 - 205

Cartier P.H. (1980) Adenine uptake by isolated rat thymocytes. J. Biol.Chem. 255, 4574 - 4582.

Chen J. J., Jones M.E. (1979) Effect of 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate on de novo pyrimidine biosynthesis in cultured Ehrlich ascites cells made permeable with Dextran Sulfate 500. J. Biol. Chem. 254, 2697 - 2704

Cohen A., Martin D.W.Jr. (1977) Inosine uptake by cultured fibroblasts from normal and purine nucleoside phosphorylase-deficient humans. J. Biol. Chem. 252, 4428 - 4430

Della Corte E., Gozzetti G., Novello F., Stirpe F. (1969) Properties of the xanthine oxidase from human liver. Biochim. Biophys. Acta 191, 164 - 166

Documenta Geigy (1968) Wissenschaftliche Tabellen, 7. Auflage J.R. Geigy AG, Basel

Edwards N.L., Recker D., Airozo D., Fox I.H. (1981) Enhanced purine salvage during allopurinol therapy: an important pharmacologic property in humans. J. Lab. Clin. Med. 98, 673 - 683

Eliot G.B. Kovensky A., Hitchings G.H., Metz E., Rundles R.W. (1966) Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. Biochem. Pharmac. 15, 863 - 880

Eliot G.B. (1978) Allopurinol and other inhibitors of urate synthesis. In: Kelley W.W., Weiner I.M. (eds.) Uric Acid. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 51, S. 485 - 514. Springer-

Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

El Kouni M.H., Cha S. (1982) Isolation and partial characterization of a 5'-nucleotidase specific for orotidine-5'-monophosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 1037 - 1041

Engelman K., Watts R.W.E., Klinenberg J.R., Sjoerdsma A., Seegmiller J.E. (1964) Clinical, physiological and biochemical studies of a patient with xanthinuria and pheochromocytoma. Amer. J. Med. 37, 839 - 861

Ericson A., Groth T., Niklasson F., de Verdier C.-H. (1980) Plasma concentration and renal excretion of adenine and 2,8-dihydroxyadenine after administration of adenine in man. Scan. J. Clin. Lab. Invest. 40, 1 - 8

Fallon H.J., Frei E., Block J., Seegmiller J.E. (1962) The uricosuria and orotic aciduria induced by 6-azauridine. J. Clin. Invest. 41, 1906 - 1914

Fasman G.D. (Hrsg.) (1975) Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, 3rd ed. Nucleic Acids-Vol. 1, S. 93 und 134, CRC-Press, Cleveland

Fox I.H., Kelley W.N. (1971) Phosphoribosylpyrophosphate in man: biochemical and clinical significance. Ann. Intern. Med. 74: 424 - 433

Fox I.H., Kelley W.N. (1972) Human phosphoribosylpyrophosphate synthetase. Kinetic mechanism and end product inhibition. J. Biol. Chem. 247, 2126 - 2131

Fox I.H., Burk L., Planet G., Goren M., Kaminska J. (1978) Pyrimidine nucleotide biosynthesis. A study of normal and purine enzyme-deficient cells. J. Biol. Chem. 253, 6794 - 6800

Fox R.M., Royse-Smith D., O'Sullivan W.J. (1970) Orotidinuria

induced by allopurinol. Science 168, 861 - 862

Fyfe J.A., Miller R.L., Krenitsky T.A. (1973) Kinetic properties and inhibition of orotidine 5'-phosphate decarboxylase. J. Biol. Chem. 248, 3801 - 3809

Galanti B., Russo M., Nardiello S., Giusti G. (1975) Activation energy, relative substrate specificity and optimum pH of guanase from human, rat, mouse and guinea pig sera and tissues. Enzyme 20, 90 - 97

Getler H., Roll P.M., Tinker J.F., Brown G.B. (1949) A study of the metabolism of dietary hypoxanthine and xanthine in the rat. J. Biol. Chem. 178, 259 - 264

Goldfinger S., Klinenberg J.R., Seegmiller J.E. (1965) The renal excretion of oxypurines. J. Clin. Invest. 44, 623 - 628

Gröbner W., Kelley W.N. (1975) Effect of allopurinol and its metabolic derivatives on the configuration of human orotate phosphoribosyltransferase and orotidine 5'-phosphate decarboxylase. Biochem. Pharmac. 24, 379 - 384

Gröbner W., Zöllner N. (1983) Der Einfluß von Nahrungspurinen und -pyrimidinen auf die Pyrimidinsynthese des Menschen. Klin. Wochenschr. 61, 1191 - 1197.

Gudas L.J., Cohen A., Ullman B., Martin D.W..Jr. (1978) Analysis of adenosine-mediated pyrimidine starvation using cultured wild -type and mutant mouse T-lymphoma cells. Somat. Cell. Genet. 4, 201 - 219

Harkness R.A., Simmonds R.J., Coade S.B. (1983) Purine transport and metabolism in man: the effect of exercise on concentrations of purine bases, nucleosides and nucleotides in plasma, urine, leucocytes and erythrocytes. Clin. Science 64, 333 - 340

- Henderson J.F., Khoo M.K.Y. (1965) Availability of 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate for ribonucleotide synthesis in Ehrlich ascites tumor cells in vitro. *J. Biol. Chem.* 240, 2358 - 2362.
- Ho C.Y., Miller K.V., Savaiano D.A., Crane R.T., Ericson K.A., Clifford A.J. (1979) Absorption and metabolism of orally administered purines in fed and fasted rats. *J. Nutr.* 109, 1377 - 1382
- Huguley C.M. Jr., Bain J.A., Rivers S.L., Scoggins R.B. (1959) Refractory megaloblastic anemia associated with excretion of orotic acid. *Blood*, 14, 615 - 634
- Ishii K., Green H. (1973) Lethality of adenosine for cultured mammalian cells by interference with pyrimidine biosynthesis *J. Cell Sci.* 13, 429 - 439
- Ito K., Uchino H. (1976) Control of pyrimidine biosynthesis in human lymphocytes. Inhibitory effect of guanine and guanosine on induction of enzymes for pyrimidine biosynthesis de novo in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 251, 1427 - 1430.
- Jezewska M.M. (1973) Xanthine accumulation during hypoxanthine oxidation by milk xanthine oxidase. *Eur. J. Biochem.* 36, 385 - 390
- Jones M.E. (1980) Pyrimidine nucleotide biosynthesis in animals: genes, enzymes, and regulation of UMP biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* 49, 253 - 279
- Kelley W.N., Rosenbloom F.M., Henderson J.F., Seegmiller J.E. (1967) Xanthine phosphoribosyltransferase in man: relationship to hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 340 - 345
- Kelley W.N., Beardmore T.D. (1970) Allopurinol: Alteration in

pyrimidine metabolism in man. Science 169, 388 - 390

Kennedy J. (1974) Dihydroorotase from rat liver: purification, properties and regulatory role in pyrimidine biosynthesis. Arch. Biochem. Biophys. 160, 358 - 365

Krenitsky T.A., Elion G.B., Strelitz R.A., Hitchings G.H. (1967) Ribonucleosides of allopurinol and oxoallopurinol. J. Biol. Chem. 242, 2675 - 2682

Krenitsky T.A., Papaioannou R., Elion G.B. (1969) Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. I. Purification, properties, and specificity. J. Biol. Chem. 244, 1263 - 1270

Krenitsky T.A., Neil S.M., Elion G.B., Hitchings G.H. (1972) A comparison of the specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. Arch. Biochem. Biophys. 150, 585 - 599.

Levene P.A., London E.S. (1929) The structure of thymonucleic acid. J. Biol. Chem. 83, 793 - 802

Levin B., Oberholzer V.G., Sinclair L. (1969) Biochemical investigations of hyperammonaemia. Lancet ii, 170 - 174

Lis E.W., Lis A.W., deHackbeil K.F. (1970) Ultraviolet-absorbing components of urine from mentally retarded children.III. Clin. Chem. 16, 714 - 721

Lomax C.A., Bagnara A.S., Henderson J.F. (1975) Studies of the regulation of purine nucleotide catabolism. Can. J. Biochem. 53, 231 - 241

McCollister R.J., Gilbert W.R.Jr., Ashton D.M., Wyngaarden J.B. (1964) Pseudofeedback inhibition of purine synthesis by 6-mercaptopurine ribonucleotide and other purine analogues. J. Biol. Chem. 239, 1560 - 1563

Mousson B., Desjacques P., Baltassat P. (1983) Measurement of xanthine oxidase activity in some human tissues. An optimized method. *Enzyme* 29, 32 - 43

Nelson D.J., Bugge C. J. L., Krasny H.C., Elion G.B. (1973) Formation of nucleotides of (6- ^{14}C) allopurinol and (6- ^{14}C) oxipurinol in rat tissues and effects on uridine nucleotide pools. *Biochem. Pharmac.* 22, 2003 - 2022

Paglia D.E., Valentine W.N. (1975) Characteristics of a pyrimidine-specific 5'-nucleotidase in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 250, 7973 - 7979

Pausch J., Wilkening J., Nowack J., Decker K. (1975) Control of pyrimidine biosynthesis in the perfused liver. Feedback inhibition of glutamine-dependent carbamoyl phosphate synthetase. *Eur. J. Biochem.* 53, 349 - 356

Plagemann P.G.W., Wohlhueter R.M., Erbe J. (1981) Facilitated transport of inosine and uridine in cultured mammalian cells is independent of nucleoside phosphorylases. *Biochim. Biophys. Acta* 640, 448 - 462

Planet G., Fox I.H. (1976) Inhibition of phosphoribosylpyrophosphate synthesis by purine nucleosides in human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 251, 5839 - 5844

Plentl A.A., Schoenheimer R. (1944) Studies in the metabolism of purines and pyrimidines by means of isotopic nitrogen. *J. Biol. Chem.* 153, 203 - 217

Pomales R., Bieber S., Friedman R., Hitchings G.H. (1963) Augmentation of the incorporation of hypoxanthine into nucleic acids by the administration of an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* 72, 119 - 120

Rauen H.M. (Hrsg.) (1964) *Biochemisches Taschenbuch*, 2. Auflage,

1. Teil, S. 643. Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New-York.

Reiter S., Simmonds H.A., Webster D.R., Watson A.R. (1983)
On the metabolism of allopurinol. Formation of allopurinol-1-
riboside in purine nucleoside phosphorylase deficiency. *Biochem. Pharmac.* 32, 2167 - 2174

Reiter S., Löffler W., Gröbner W., Zöllner N. (1984)
Influence of dietary purines on allopurinol metabolism and
allopurinol induced oroticaciduria. *Adv. Exp. Med. Biol.* 165 A,
323 - 326

Reiter S., Löffler W., Gröbner W., Zöllner N. (1986 a)
Allopurinol-1-riboside formation and HGPRT-deficiency.
Adv. Exp. Med. Biol. 195 A, 447 - 451

Reiter S., Löffler W., Gröbner W., Zöllner N. (1986 b) Urinary
oxipurinol-1-riboside excretion and allopurinol-induced oroticaci-
duria.
Adv. Exp. Med. Biol. 195 A, 453 - 460

Rogers L.E., Porter F.S. (1968) Hereditary orotic aciduria II, a
urinary screening test. *Pediatrics* 42, 423 - 428

Rosenbloom F.M., Kelley W.N., Miller J., Henderson J.F., Seeg-
miller J.E. (1967) Inherited disorder of purine metabolism. Cor-
relation between central nervous sytem dysfunction and biochemi-
cal defects.
JAMA 202, 103 - 105

Schulmar J.D., Greene M.L., Fujimoto W.Y., Seegmiller J.E. (1971)
Adenine therapy for Lesch-Nyhan syndrome. *Pediat. Res.* 5,77 - 82

Seegmiller J.E., Klinenberg J.R., Miller J., Watts R.W.E. (1968)
Suppression of glycine-¹⁵N incorporation into urinary uric acid
by adenine-8-¹³C in normal ad gouty subjects. *J. Clin. Invest.*

47, 1193 - 1203

Simmonds H.A., Hatfield P.J., Cameron J.S., Jones A.S., Cadenhead A. (1973 a) Metabolic studies of purine metabolism in the pig during the oral administration of guanine and allopurinol. Biochem. Pharmac. 22, 2537 - 2551

Simmonds H.A., Rising T.J., Cadenhead A., Hatfield P.J., Jones A.S., Cameron J.S. (1973 b) Radioisotope studies of purine metabolism during administration of guanine and allopurinol in the pig. Biochem. Pharmac. 22, 2553 - 2563

Smith L.H.Jr., Sullivan M., Huguley C.M.Jr. (1961) Pyrimidine metabolism in man. IV. The enzymatic defect of orotic aciduria. J.Clin. Invest. 40, 656 - 664

Snyder F.F., Henderson J.F. (1973) Effects of elevated intracellular ATP and GTP concentrations on purine ribonucleotide synthesis and interconversion. Can.J. Biochem. 51, 943 - 948

Snyder F.F., Seegmiller J.E. (1976) The adenosine-like effect of exogenous cyclic AMP upon nucleotide and PP-ribose-P concentrations of cultured human lymphoblasts. FEBS Letts. 66, 102 - 106

Snyder F.F., Hershfield M.S., Seegmiller J.E. (1978) Cytotoxic and metabolic effects of adenosine and adenine on human lymphoblasts. Cancer Res. 38, 2357 - 2362

Snyderman S.E., Sansaricq C., Chen W.J., Norton P.M., Phansalkar S.V. (1977) Argininemia. J.Pediatr. 90, 563 - 568

Sonoda I., Tatibana M. (1978) Metabolic fate of pyrimidines and purines in dietary nucleic acids ingested by mice. Biochim. Biophys. Acta 521, 55 - 66

Tatibana M., Shigesada K. (1972) Control of pyrimidine biosynthesis in mammalian tissues. V. Regulation of glutamine-dependent

carbamyl phosphate synthetase: activation by 5-phosphoribosyl 1-pyrophosphate and inhibition by uridine triphosphate. J. Biochem. (Tokyo) 72, 549 - 560

Tax W.J.M., Veerkamp J.H., Trijbels F.J.M., Schretlen E.D.A.M. (1976) Mechanism of allopurinol-mediated inhibition and stabilization of human orotate phosphoribosyltransferase and orotidine phosphate decarboxylase. Biochem. Pharmac. 25, 2025 - 2032

Tax W.J.M., Veerkamp J.H. (1979) Inhibition of orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase of human erythrocytes by purine and pyrimidine nucleotides. Biochem. Pharmac. 28, 829 - 831

Traut T.W., Jones M.E. (1977) Inhibitors of orotate phosphoribosyltransferase and orotidine-5'-phosphate decarboxylase from mouse Ehrlich ascites cells: a procedure for analyzing the inhibition of a multi-enzyme complex. Biochem. Pharmac. 26, 2291 - 2296

Van Acker K.J., Simmonds H.A., Potter C., Cameron J.S. (1977) Complete deficiency of adenine phosphoribosyltransferase. Report of a family. N.Engl.J.Med. 297, 127 - 132

Voelter W., Zech K., Arnold P., Ludwig G. (1980) Determination of selected pyrimidines, purines and their metabolites in serum and urine by reversed-phase ion-pair chromatography. J. Chromatogr. 199, 345 - 354

Walser M. (1983) Urea cycle disorders and other hereditary hyperammonemic syndromes. In: Stanbury J.B., Wyngaarden J.B., Fredrickson D.S., Goldstein J.L., Brown M.S. (eds) The metabolic basis of inherited disease, 5th ed, McGraw-Hill, New-York, S. 402 - 438

Way J.L., Parks R.E.Jr. (1958) Enzymatic synthesis of 5'-phosphate nucleotides of purine analogues. J. Biol. Chem. 231, 467 - 480

Wood M.H., O'Sullivan W.J., Wilson M., Tiller D.J. (1974) Potentiation of an effect of allopurinol on pyrimidine metabolism by chlorothiazide in man. Clin. Exp. Pharmac. Physiol. 1, 53 - 58

Wyngaarden J.B., Seegmiller J.E., Laster L., Blair A.E. (1959) Utilization of hypoxanthine, adenine and 4-amino -5-imidazole-carboxamide for uric acid synthesis in man. Metabolism 8, 455 - 464

Yushok W.D. (1971) Control mechanisms of adenine nucleotide metabolism of ascites tumor cells. J. Biol. Chem. 246, 1607 - 1617

Zöllner N. (1957) Energiestoffwechsel. In: Zöllner N. (Hrsg.): Thannhausers Lehrbuch des Stoffwechsels und der Stoffwechselkrankheiten. 2. Auflage, S. 2-87. Thieme-Verlag, Stuttgart.

Zöllner N. (1963) Eine einfache Modifikation der enzymatischen Harnsäurebestimmung. Normalwerte in der deutschen Bevölkerung. Z. Klin. Chem. 1, 178 - 182

Zöllner N., Gröbner W. (1970) Der unterschiedliche Einfluß von Allopurinol auf die endogene und exogene Uratquote. Eur. J. Pharmacol. 3, 56 - 58

Zöllner N., Gröbner W. (1971) Influence of oral ribonucleic acid on orotaciduria due to allopurinol administration. Z. Ges. Exp. Med. 156, 317 - 319

Zöllner N., Gröbner W. (1977) Dietary feedback regulation of purine and pyrimidine biosynthesis in man. Ciba Foundation Symposium 48 (new series), 165 - 178

Zylka J.M., Plagemann P.G.W. (1975) Purine and pyrimidine transport by cultured Novikoff cells. Specificities and mechanism of transport and relationship to phosphoribosylation. J. Biol. Chem. 250, 5756 - 5767

LEBENS LAUF

Name: Annamaria Beltinger

Geburtstag und -ort: 26.09.1959 in Günzburg/Donau

Eltern: Klaus Beltinger, Diplomlandwirt
Walburga Beltinger, geb. Thunn

Volksschule: 1965 - 67 Bozen-Rentsch, Südtirol
1967 - 69 Wasserburg/Inn, Obb.

Gymnasium: 1969 - 78 Luitpold-Gymnasium Wasserburg/Inn

Abiturprüfung: 26.06.1978

Studium der Medizin: 18.09.78 Immatrikulation an der Ludwig-
Maximilians-Universität München,
seit Studienbeginn Stipendiatin
der Bayerischen Begabtenförderung,
seit Herbst 79 Stipendiatin der
Konrad-Adenauer-Stiftung für Be-
gabtenförderung

Physikum: 26.08.1980
I. Staatsexamen: 27.08.1981
II. Staatsexamen: 26.08.1983
III. Staatsexamen: 29.10.1984
Approbation: 29.10.1984

Berufstätigkeit: November 1984 bis August 1985 Assistenz-
ärztin an der Neurologischen Klinik der
Universität Ulm,
Chefarzt Prof. Dr. Kornhuber

Seit September 1985 Assistenzärztin an der
Neurologischen Klinik des Zentralklinikums
Augsburg,
Chefarzt Prof. Dr. Stöhr

23.08.1985 Heirat mit Christian Jablonski

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einführung	1
II. Ziel der Arbeit	13
III. Materialien und Methoden	18
1. Versuchsbedingungen und Ablauf des Ernährungsversuchs	18
2. Verabreichte Diät	22
2.1. Berechnung des Kalorienbedarfs	22
2.2. Zusammensetzung der Diät	22
3. Meßmethoden	25
3.1. Enzymatische Harnsäurebestimmung	25
3.2. Durchführung der hochdruckflüssigkeits-chromatographischen Messungen	26
IV. Ergebnisse	33
1. Einfluß von Nahrungspurinen auf die Allopurinol-induzierte Orotacidurie und Orotidinurie	33
1.1. Trennleistung, Recovery, Linearität und Reproduzierbarkeit der Ionenpaar-HPLC-Methode zur Bestimmung von Orotsäure und Orotidin	33
1.2. Orotacid- und Orotidinurie unter Allopurinoleinnahme	39
2. Absorption und Metabolisierung der oral verabreichten Purine sowie von Allopurinol	53
2.1. Trennleistung des Umkehrphasensystems	53
2.2. Absorption und Metabolisierung der oral verabreichten Purine	59
2.3. Absorption und Metabolisierung von Allopurinol	74

V. Diskussion	85
1. Versuchsplanung	85
2. Zusammenhang zwischen Absorptionsquote und Metabolisierung der verabreichten Purine und ihrer Wirkung auf die Allopurinol-induzierte Orotacid- und Orotidinurie	87
3. Einfluß der verabreichten Purine auf Absorption und Metabolisierung von Allopurinol	108
VI. Zusammenfassung	115
Verzeichnis der gebrauchten Abkürzungen	119
Literaturverzeichnis	120
Lebenslauf	131

